

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.-A. Martini

**Der Einfluß experimenteller
Leberschädigung auf die Reduktion von
Testosteron und Androstendion
durch Rattenlebergewebe**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin

der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wolfgang Spuck

aus Lich

Marburg/Lahn 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.-A. Martini

Der Einfluß experimenteller Leberschädigung auf die Reduktion von Testosteron und Androstendion durch Rattenlebergewebe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin

der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wolfgang Spuck

aus Lich

Marburg/Lahn 1973

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg an der Lahn
am 27.3.1973

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. H. Gerdes

Correferent: Prof. Dr. G.A. Martini

Meinen Eltern





Abkürzungen:

A	= Andronstendion
CCl ₄	= Tetrachlorkohlenstoff
DC	= Dünnschichtchromatographie
DHA	= Dehydroepiandrosteron
E	= Extinktion
G-6-P	= Glucose-6-Phosphat
G-6-P DH	= Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
H	= Hypothalamus
HVL	= Hypophysenvorderlappen
ICSH	= Zwischenzellstimulierendes Hormon
KHR	= Krebs-Henseleit-Ringer-Lösung
LH	= Luteinisierungshormon
M	= Mischung
N	= Anzahl der Versuchstiere
n	= Freiheitsgrade
NAD	= Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	= Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
P	= 1. Phosphat; 2. Phosphatpuffer; 3. Wahrscheinlichkeit
RF	= releasing factor
RM	= Reaktionsmischung
s	= Standardabweichung
SL	= Substratlösung
T	= Testosteron
t	= 1. Verteilungsfaktor; 2. Zeit
UDP	= Uridindiphosphat
UTP	= Uridintriphosphat
$\bar{x}$	= Mittelwert

Nomenklatur der beschriebenen Steroide :

Trivialname	Systematischer Name ⁺
Aetiocholanolon	5 β -Androstan-3 α -ol-17-on
Androstendiol	Androsta-5-en-3 β ,17 β -diol
Androstendion	Androsta-4-en-3,17-dion
Androsteron	5 α -Androstan-3 α -ol-17-on
Cortisol (Hydrocortison)	Pregna-4-en-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dion
Dehydroepiandrosteron	Androsta-5-en-3 β -ol-17-on
Epiandrosteron	5 α -Androstan-3 β -ol-17-on
Epitestosteron	Androsta-4-en-17 α -ol-3-on
Pregnenolon	Pregna-5-en-3 β -ol-20-on
Progesteron	Pregna-4-en-3,20-dion
Testosteron	Androsta-4-en-17 β -ol-3-on

⁺ Nach HÜBENER und STAIB : Biochemie der NNR-Hormone
Thieme, Stuttgart 1965 (29)

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. DEFINITION, BIOSYNTHESE und BIOLOGISCHE WIRKUNG DER ANDROGENE	3
3. HEPATISCHE REGULATION DER ANDROGENEN HOMÖOSTASE	8
3.1. Interkonversion	8
3.2. Inaktivierung und Ausscheidung	12
4. MATERIAL UND METHODIK	18
4.1. Versuchstiere und experimentelle Leberschädigung	18
4.2. Durchführung der Leberschnittinkubationen	20
4.3. Durchführung der Mikrosomeninkubationen mit NADP - generierendem System	23
4.4. Spektralphotometrische Messung von Testosteron und Androstendion	26
4.5. Dünnschichtchromatographische Trennung einzelner C ₁₉ - Steroide	29
4.6. Gaschromatographische Trennung einzelner C ₁₉ - Steroide	31
4.7. Eiweißbestimmungen	33
4.8. Mathematisch-statistische Auswertung	34
5. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	36
5.1. Verhalten der Tiergewichte unter Versuchsbedingungen	36
5.2. Eiweißbestimmungen	37
5.3. Versuche mit Leberschnittinkubationen	38
5.4. Versuche mit Mikrosomeninkubation	42
5.5. Versuch einer Enzyminduktion durch Cortisol	45

5.6.	Gaschromatographische Analyse der Inkubationsextrakte	46
5.6.1.	Wiederfindungsmessungen	46
5.6.2.	Beschreibung des Metabolitenmusters	46
5.6.3.	Das Verhältnis von Androsteron zu Aetiocholanolon unter experimenteller Leberschädigung	47
6.	DISKUSSION	52
6.1.	Einfluß der toxischen Leberschädigung auf Körpergewicht und makroskopische Organbefunde der Versuchstiere	52
6.2.	Wirksamkeit und Mechanismus toxischer Leberschädigung auf die 4-en-5-Reduktion von Testosteron und Androstendion	54
	a) nach Tetrachlorkohlenstoff	54
	b) nach Phalloidin	57
	c) nach Aethylalkohol	59
6.3.	Beeinflussung von Steroid-4-en-5-Reduktase durch Pharmaka, Nahrungskarenz, experimentellen Diabetes mellitus und experimentelle arterielle Hypertonie	63
6.4.	Mögliche Schlußfolgerungen zur Pathophysiologie der hormonellen Homöostase	67
7.	ZUSAMMENFASSUNG	68
8.	LITERATURVERZEICHNIS	70

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Klinische Symptome der Feminisierung bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen sind seit langem bekannt. Gynäkomastie, Hodenatrophie und Verlust des maskulinen Behaarungstyps veranlaßten zuerst EDMONDSON, GLASS und SOLL (1939 (19)) einen Zusammenhang mit Störungen des Oestrogenstoffwechsels im Sinne eines verzögerten Oestrogenabbaus anzunehmen. Zahlreiche Untersuchungen der letzten drei Jahrzehnte haben bis heute jedoch keine befriedigende Erklärung für eine gesteigerte Oestrogenwirkung liefern können, wie sie dem häufig verwendeten Begriff des "sekundären Hyperoestrogenismus bei Leberzirrhose" entspricht.

Unter der Vorstellung, daß bei chronischen Lebererkrankungen auch Androgenstoffwechselstörungen zu erwarten sind, rücken in den letzten Jahren zunehmend Beobachtungen in den Vordergrund, die als Ursache des Feminisierungssyndroms auf eine verminderte biologische Aktivität der C_{19} -Steroide hinweisen. So fanden RAITH u. Mitarb. (32, 56) sowie VERMEULEN und PETERSON (51) bei Patienten mit Leberzirrhose erniedrigte Testosteronproduktionsraten, die jedoch allein noch keinen Schluß auf eine gestörte Leydigzell-Funktion zulassen, solange nicht das Ausmaß der peripheren Interkonversion sicher festgelegt werden kann.

BREUER et al. fanden bei Zirrhosepatienten eine erhöhte Testosteronbindungskapazität im Serum (12). Inkubationen von Testosteron und Androstendion mit gesundem und zirrhotischem Lebergewebe zeigten, daß sowohl qualitative als auch quantitative Änderungen des Androgenmetabolitenmusters auftreten (ENGELHARDT u. Mitarb., 1971 (21), BERCOVICI u. Mitarb., 1971 (4)).

Eine direkte Beeinflussung der androgenen Homöostase durch die Leber scheint nach den gegenwärtigen Kenntnissen auf verschiedene Weise möglich zu sein: insbesondere durch Störungen des intrazellulären Steroidhormontransportes und durch Beeinflussung von Interkonversion, Abbau und Ausscheidung als Folge von Enzym- und Coenzym-schädigungen. Eine weitere Klärung androgener Stoffwechselstörungen bei Lebererkrankungen muß zunächst Ausmaß und Schädigungsmechanismus dieser intrazellulären Stoffwechselleistungen zu erfassen versuchen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher im Modellversuch mit Rattenlebern der Einfluß experimenteller akuter und chronischer Leberschädigung auf die Inaktivierung von Testosteron und Androstendion untersucht werden. Anhand der Ergebnisse sollen mögliche Rückwirkungen auf den Androgenstoffwechsel bei Lebererkrankungen diskutiert werden. Im Einzelnen soll nach akuter Leberschädigung mit Tetrachlorkohlenstoff, Phalloidin und Äthylalkohol sowie nach chronischer Schädigung mit Äthanol das Ausmaß der Änderung der 4-en-5-Reduktase bestimmt und Änderungen im Metabolitenmuster untersucht werden.

2. DEFINITION, BIOSYNTHESE UND BIOLOGISCHE

WIRKUNG DER ANDROGENE

Androgene sind Steroidhormone, die als männliche Sexualhormone von Hoden und Nebennierenrinden sezerniert werden (siehe Abb. 1). Sie besitzen proteinanabole Wirkung (16), die speziell auf die Erfolgsorgane Keimdrüsenepithel, Haut, Muskulatur und Knochen gerichtet ist. Das biologisch wirksamste androgene Hormon ist das Testosteron. Als Vorstufen mit geringerer androgener Aktivität werden im Plasma Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Androstendion gefunden. Im Urin finden sich als Metaboliten Androsteron, Aetiocholanolon, Dehydroepiandrosteron, Testosteron, Androstendion, 5α - und 5β -Androstadiol.

Die Biosynthese von Testosteron vollzieht sich beim Mann in den Leydig'schen Zwischenzellen im Hoden über die Vorstufen Progesteron und 17α -Hydroxyprogesteron. Durch Abspaltung der C_{17} -Seitenkette entstehen die sogenannten C_{19} -Steroide, die das biochemische Grundgerüst aller Androgene darstellen. Über Androstendion wird durch Reduktion am C_{17} -Atom Testosteron gebildet. Über periphere Interkonversion siehe 3,1 (Übersichten über Testosteronbiosynthese siehe bei 17, 42, 48, 55, 78).

In den Nebennierenrinden wird prinzipiell auf dem gleichen Weg wie die Glucocorticoide vorwiegend Dehydroepiandrosteron durch Abspaltung der Seitenkette des 17α -Hydroxypregnenolons gebildet. Unter dem Einfluß der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen und der 3-Ketosteroid-4-en-5-en-Isomerasen kann Dehydroepiandrosteron zu Androstendion umgesetzt werden. Als weiteres quantitativ bedeutsames Androgen entsteht über Dehydroepiandrosteron und Androstendion Androsteron.

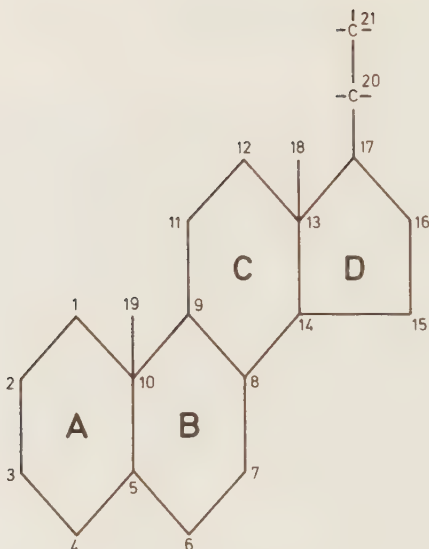


Abb. 1 : Grundgerüst der Steroidhormone

An den C-Atomen 3, 4, 5, 6, 11, 17, 18, 20 und 21 können Hydroxylierungen, Hydrierungen und Dehydrierungen ablaufen, die zu den Metaboliten der einzelnen Hormongruppen führen:

- C₂₁-Steroide = Glucocorticoide,
Mineralocorticoide,
Gestagene,
- C₁₉-Steroide = Androgene (-C₂₀-C₂₁-Seitenkette fehlt; entweder Doppelbindung im Ring A zwischen C₄=C₅ oder C₅=C₆ oder hydriertes C₅-Atom)
- C₁₈-Steroide = Oestrogene (-C₂₀-C₂₁-Seitenkette und C₁₉-Atom fehlen; Doppelbindungen im Ring A zwischen C₁=C₂; C₃=C₄ und C₅=C₁₀)

Wie die Glucocorticoide werden auch die Androgene - insbesondere Testosteron - tagesrhythmisch sezerniert. Höchste Plasmakonzentrationen finden sich dabei in den frühen Morgenstunden, niedrigste am Abend (NIESCHLAG, ISMAIL, 1970 (49)). Die Regulation der Testosteronsynthese unterliegt der hypophysären Gonadotropinsekretion. Zwischen peripherem steroidproduzierendem Organ und Hypophyse mit übergeordnetem Hypothalamus besteht ein Rückkopplungsmechanismus im Sinne eines Regelkreises, wobei das Testosteron die Regelstrecke, das hypothalamische gonadotropine-releasing-factor-system den Stellmotor darstellt und das hypophysäre Gonadotropinsystem als Servomotor fungiert (SCHRIEFERS, 1968 (62)), siehe Abb. 2.

Alle Steroidhormone mit androgener Wirksamkeit induzieren die Eiweißsynthese und entfalten ihre biologische Wirkung an der Muskulatur, an Längen- und periostalem Knochenwachstum, an der Ausbildung des maskulinen Behaarungstyps und sind so für die Ausbildung des männlichen Phänotyps verantwortlich. Im Tierversuch zeigen die C_{19} -Steroide unterschiedliche androgene Aktivität, wobei die Wirkung von Androsteron, Androstendion und Dehydroepiandrosteron etwa nur 5 - 25 % der Testosteronwirkung erreicht (DORFMAN, SHIPLEY, 1956 (18)).

Mit Hilfe von Sekretions- und Produktionsratenbestimmungen (HORTON, TAIT (27)) ließ sich zeigen, daß beim Mann Testosteron, bei der Frau Androstendion das primäre androgene Hormon darstellt. Über Produktionsraten siehe Tabelle 1. Physiologische Plasmakonzentrationen von Testosteron liegen beim Mann zwischen 400 und 800 ng/%, bei der Frau zwischen 30 und 90 ng/%.

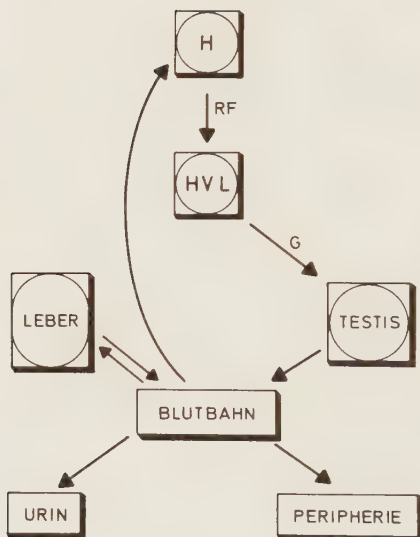


Abb. 2 : Regulationsschema der Testosteronhomöostase
G = Gonadotropine (ICSH, LH); H = Hypothalamus;
HVL = Hypophysenvorderlappen; RF = releasing
factors (gonadotropine releasing factor)

Tabelle 1 :

Androgenproduktionsraten (mg/Tag)

(nach R. NEHER, "Biosynthese des Testosteron",
Symp. Dtsch. Ges. Endokr. 13 (1967). 1 (48)

	T	A	DHA	DHA-S
Sekretion:				
M	6.1 - 7.8	0.5 - 1.4	3 - 7	6
F	0.14 - 0.8	3.4	2 - 7	6
Produktion:				
M	6.5 - 7.2			16
F	0.3 - 2.9	3.3	6	7 - 10

M = Männer;

F = Frauen;

T = Testosteron;

A = Androst-4-en-3,17-dion;

-S = Sulfat;

DHA = Dehydroepiandrosteron.

"Sekretion" = Blutproduktionsrate, zusammengesetzt aus
Sekretion endokriner Drüsen und Inerkonversion
in Leber und anderen Organen.

"Produktion" = Urinproduktionsrate, zusammengesetzt aus
Nierenausscheidung und Konversion an
anatomischen Orten, die nicht mit dem
Plasmapool äquilibriert sind.

3. HEPATISCHE REGULATION DER ANDROGENEN HOMÖOSTASE

3.1. Interkonversion

Unter intrahepatischer Interkonversion von Androgenen wird die reversible Umwandlung von Testosteron, Androstendion, Dehydroepiandrosteron, Androstendiol, Dehydroepiandrosteronsulfat, Androstendiolsulfat und Epitestosteron in der Leber verstanden (Abb. 3: 7 - 13). Prinzipiell ist diese Interkonversion auch in anderen Organen wie Muskel, Niere und Haut möglich (BLAQUIER u. Mitarb., 1967 (5) , ENGELHARDT u. Mitarb., 1970 (22), KELCH u. Mitarb., 1971 (33)). Quantitativ spielt jedoch bei Gesunden nur die hepatische Interkonversion eine Rolle, bei der vor allem Testosteron aus biologisch weniger aktiven Vorstufen wie Dehydroepiandrosteron und Androstendion entstehen kann. Etwa 10 - 20 % der gesamten Testosteronproduktion beim Mann, etwa 60 % bei der Frau stammen aus der hepatischen Interkonversion (siehe Abb. 3).

Die Umwandlung der 3 β -Hydroxy-5-en-steroid-Dehydroepiandrosteron und Androstendiol in die analogen 3-Keto-4-en-steroid-Androstendion und Testosteron katalysieren spezifische 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen und 3-Ketosteroid-4-en-5-en-Isomerasen. Die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen befinden sich vorwiegend im cytoplasmatischen Raum der Leberzelle (TOMKINS, 1956 (81)). Die 3-Ketosteroid-4-en-5-en-Isomerasen konnten in der Leber bislang nicht lokalisiert werden. Aufgrund von Versuchen von KLEMPIEN u. Mitarb. (35) zum DHA-Metabolismus konnte jedoch auf ein solches Enzym in der Leber geschlossen werden. Der Nachweis von Enzymen, die die Umlegung der 4=5-Doppelbindung in eine 5=6-Doppelbindung katalysieren, gelang bei der Synthese von

Die Hydroxylierung von 17-Ketosteroiden (Dehydroepiandrosteron, Androstendion) zu 17 β -Hydroxysteroiden (Androstendiol, Testosteron) geschieht unter dem Einfluß von 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (Erstbeschreiber: SWEAT u. Mitarb., 1950 (76)). Diese Enzyme sind beim Menschen von LITTMANN u. Mitarb. 1971 (43) näher charakterisiert worden. Ihre Lokalisation im Cytoplasma und in der mikrosomalen Fraktion bei verschiedenen Tierspezies wurde von ENDAHL u. Mitarb. 1960 (20) beschrieben (siehe Abb. 5). Die Diskussion über die Bildung von Epitestosteron aus Androstendion und die Umwandlung zum isomeren Testosteron ist noch nicht abgeschlossen (Befunde hierzu bei 79, 88).

Neben den freien Steroiden lassen sich Sulfatester von Dehydroepiandrosteron und Androst-5-en-3,17-diol mit androgener Wirksamkeit in der Leber nachweisen (ROBERTS u. Mitarb. 1961 (57)). Das sogenannte "aktive Sulfat", ein Adenosin-3'-5'-diphosphosulfat, wird durch eine Sulfurylase an das Steroid gekoppelt (STAIB u. Mitarb. 1960 (73)).

Als Coenzyme für die Übertragung von Wasserstoffprotonen stehen in der Leberzelle Pyridinnucleotide zur Verfügung. NAD^+ reagiert mit den 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen und den mikrosomalen 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Die Regeneration reaktionsfähigen Coenzym NAD^+ geschieht durch die Atmungskettenphosphorylierung, den Fettsäureabbau und die Glycolyse. NADP^+ übernimmt den Wasserstofftransport für die cytoplasmatischen 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen und für die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Die Regeneration dieses Coenzym erfolgt vorwiegend über den Glucosestoffwechsel und die Lipidsynthese (s.u.).

Eine Beeinflussung der intrahepatischen Interkonversion durch Leberschädigungen ist denkbar:

1. über direkte Schädigung der Enzym-de-novo-Synthese durch toxische Substanzen,
2. über eine Hemmung der Enzyminduktion und/oder kompetitive Hemmung, wie sie bei Gallensäuren durch Cholestase vermutet wird (SJÖVALL, HUTTERER, DENK u. Mitarb. (15, 30, 69)),
3. über indirekte Enzymhemmung durch mangelnde Bereitstellung an reaktionsfähigem Coenzym.

3.2. Inaktivierung und Ausscheidung

Die Inaktivierung der C_{19} -Steroide erfolgt zum überwiegenden Anteil in der Leber, die Ausscheidung im Gegensatz zu der der Oestrogene (C_{18} -Steroide) über die Niere. Nur ein geringer Anteil androgener Metaboliten wird über die Gallenwege ausgeschieden. Dem enterohepatischen Kreislauf androgener Metaboliten dürfte daher keine wesentliche Bedeutung zukommen, wie es für die Oestrogene von verschiedenen Autoren angenommen wird (ADLERCREUTZ, 1970 (2), BOLT u. Mitarb., 1966 (11), SANDBERG u. Mitarb., 1967 (58)).

Der irreversible Verlust der biologischen Aktivität aller Androgene geht einher mit der Bildung von Androstanderivaten. Die Androstanderivate entstehen durch Hydrierung am C_5 -Atom, wobei die 4-5-Doppelbindung geöffnet wird (siehe Abb. 4 u. 5). Biochemisch entsteht ein neues Asymmetriezentrum am C_5 -Atom mit der Möglichkeit zur Bildung stereoisomerer 5α -Androstan- und 5β -Androstanderivate. Beide Moleküle unterscheiden sich durch eine plane bzw. gewinkelte sterische Konfiguration zwischen Ring A und Ring B. Biologische androgene Aktivität besitzen nur einige der planen 5α -Formen (CASPI u. Mitarb., 1953 (14)). In verschiedenen Entwicklungsstadien (Kindheit, Pubertät) konnte TELLER 1967 beim Menschen Änderungen im Verhältnis der 5α - zu 5β -Metaboliten zugunsten der biologisch möglicherweise aktiven 5α - konfigurierten Androgene nachweisen (80).

An der Bildung der 5α - und 5β -Derivate sind spezifische Steroidhydrogenasen beteiligt. SCHNEIDER u. Mitarb. (52 - 61); PETERSON u. Mitarb. (52) sowie CASPI u. Mitarb. (14) haben Anfang der fünfziger Jahre mit Hilfe

von Leberperfusions- und -inkubationsversuchen zuerst auf die entscheidende Bedeutung dieser Enzyme bei der irreversiblen Inaktivierung der Androgene hingewiesen. Die 5β -Reduktasen fanden TOMKINS u. ISSELBACHER 1954 (84) im Leberzytoplasma, die 5α -Reduktasen wurden von FORCHIELLI u. DORFMAN 1956 (24) sowie von TOMKINS 1957 (82, 83) durch fraktionierte Sedimentation in der mikrosomalen Fraktion nachgewiesen. McGUIRE u. Mitarb. zeigten außerdem, daß die 5α -Reduktasen substratspezifische Enzyme sind (44, 47). Schwach polare Steroide wie Testosteron werden schneller inaktiviert als höher polare Steroide mit zahlreichen Hydroxylgruppen (Cortisol, Cortison, Corticosteron) (40). LEYBOLD u. STAUDINGER wiesen geschlechtsabhängige Unterschiede der mikrosomalen Reduktaseaktivitäten nach, die bei weiblichen Ratten höher sind als bei männlichen (39).

Die $5\alpha/\beta$ -Reduktasen reagieren mit NADP^+ als Coenzym. Zur Bereitstellung ausreichender Coenzymkonzentrationen ist eine ungestörte Glucosephosphorylierung notwendig, die zum Beispiel im Hungerzustand oder bei experimentellem Alloxandibetes nicht gewährleistet ist (SCHRIEFERS, 1968 (62, 63, 67)); GUSTAFSSON u. LISBOA (26) sowie SWEAT u. SAMUELS (75)) zeigten, daß die Regeneration von NADP^+ auch über den Citratzyklus vonstattengehen kann. Schließlich konnte in Anwesenheit anorganischen Phosphats oder Arsenats eine bislang unter Versuchsbedingungen noch nicht beobachtete Coenzymwirkung von NAD^+ nachgewiesen werden, die jedoch nur für die 5α -Reduktion zutrifft (41).

Die durch die $5\alpha/\beta$ -Reduktasen entstandenen 3-Keto-Androsterinderivate werden durch $3\alpha/\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen in die im Urin nachweisbaren Androgenmetaboliten umgewandelt (siehe Abbildung 4 und 5).

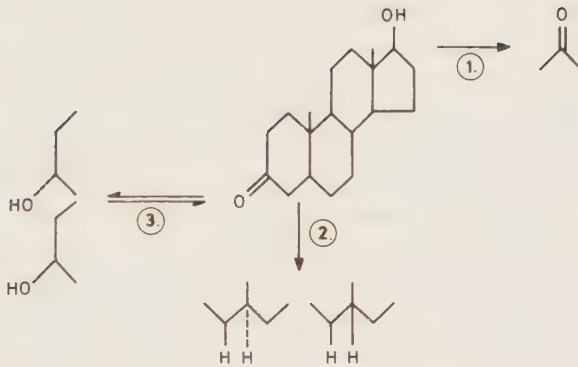


Abb. 5 : Enzymatische Reaktionen am Testosteronmolekül in der Leber

- 1) 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen zu Androstendion;
- 2) 5 α / β -Reduktasen zu 5 α / β -Androstan-Derivaten;
- 3) 3 α / β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen zu 3 α / β -Hydroxy-5 α / β -Androstan-Derivaten

Die quantitativ bedeutsamsten sind Aetiocholanolon, Androsteron, Epiandrosteron, 5 α -Androstandiol und 5 β -Androstandiol. In vergleichsweise geringen Mengen werden Testosteron, Androst-4-en-3,17-dion, Dehydroepiandrosteron und Epitestosteron ausgeschieden (TAMM, 1967 (79); PRUNTY, 1966 (55)). Die Aus-

scheidung der Androgene im Urin erfolgt entweder in Koppelung an Glucuronsäure, Sulfat oder zum kleineren Teil als freie Steroide. Die Bildung der Glucuronide geschieht unter dem Einfluß der Glucuronyl-Transferase - 1956 von ISSELBACHER (31) an Mikrosomenpräparationen von Meerschweinchenlebern charakterisiert - durch Bindung des Steroids an Uridindiphosphoglucuronsäure. Die Uridindiphosphoglucuronsäure entsteht unter Verbrauch von Uridintriphosphat aus Glucose-1-Phosphat über Uridindiphosphatglucose. Wie die $5\alpha/\beta$ -Reduktion von einer ausreichenden Bereitstellung reaktionsfähigen Coenzyms aus dem Kohlenhydratstoffwechsel abhängt, ist auch die Steroidglucuronidbildung auf einen ungestörten Kohlenhydratstoffwechsel durch ausreichende Substratbereitstellung in Form energiereicher Glucoseverbindungen angewiesen (62, 67) (s. Abb. 6). Androsteron und Aetiocholanolon werden vorwiegend als Glucuronide ausgeschieden, Epiandrosteron und Dehydroepiandrosteron dagegen nahezu nur als Sulfatester (TAMM, 1967 (79); KLEMPIEN u. Mitarb., 1961 (35); STAIB, 1967 (74)). Über die Koppelung von Androgenmetaboliten an "aktives Sulfat" siehe bei 3.1.

Die Bedeutung der $5\alpha/\beta$ -Reduktion für die Inaktivierung der Androgene läßt vermuten, daß Aktivitätsänderungen der spezifischen $5\alpha/\beta$ -Reduktasen entscheidenden Einfluß auf die hormonelle Homöostase haben können und damit u.U. eine wesentliche Rolle in der Adaptation des hormonellen Regelkreises an Erkrankungsbedingungen spielen. Da diese Enzyme vorwiegend in der Leber nachweisbar sind, schien es von Interesse, ihr Verhalten unter Schädigungsbedingungen zu studieren und somit weitere Informationen über die Mechanismen der Beeinflussung des Androgenstoffwechsels bei Leberschädigungen zu erhalten.

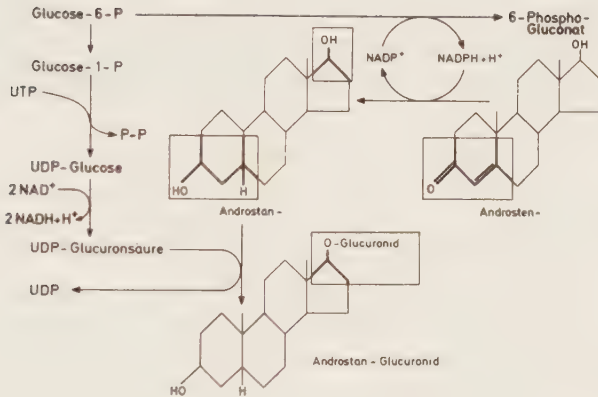


Abb. 6: Beziehungen zwischen Kohlenhydrat- und Steroidstoffwechsel (nach SCHRIEFERS, "Factors Regulating the Metabolism of Steroids in the Liver", Schering Symp. on Biodyn. and Mechan. of Action of Steroid Horm., 1968 (62)).

4. MATERIAL UND METHODIK

4.1. Versuchstiere und experimentelle Leberschädigung

Als Versuchstiere wurden 200 - 250 g schwere männliche Wistarratten (Fa. Iwanovas, Kißlegg/Allgäu) verwendet, die Standardfutter der Fa. Altromin, Lage und Trinkwasser ad libitum bekamen. Mit einer Kontrollgruppe unbehandelter Tiere (N = 24) wurden drei Versuchstiergruppen mit verschiedenen experimentellen Leberschädigungen verglichen.

a) Eine Gruppe (N = 9) bekam einmalig subcutan 5 ml/kg Körpergewicht Tetrachlorkohlenstoff in die Nackenhaut injiziert. Dekapitation der Tiere nach drei bzw. zwölf Stunden.

b) Eine zweite Gruppe (N = 9) bekam einmalig subcutan 5 ml/kg Körpergewicht Phalloidin in wässriger Lösung (100 μ g/ml) in die Nackenhaut injiziert. Dekapitation nach drei bzw. zwölf Stunden.

c) Die dritte Gruppe (N = 19) bekam oral über die Dauer von einer, drei, sechs und zehn Wochen Trinkwasser mit Aethanolzusatz (15 w/w) ad libitum zugeführt. 7 weitere Tiere wurden nach achtwöchiger oraler Trinkwasser/Aethanolzufuhr zwei weitere Wochen mit reinem Trinkwasser versorgt.

d) In einer weiteren Versuchsanordnung bekamen jeweils 3 Tiere der Kontrollgruppe sowie der tetrachlorkohlenstoffvorbehandelten und der phalloidinvorbehandelten Gruppe zwei Stunden vor der Dekapitation eine einmalige subcutane Injektion mit Cortisol (in wässriger Lösung 5 mg/kg Körpergewicht).

Die Dekapitation der Ratten erfolgte durch Nackenschlag und Eröffnen der Halsgefäße. Nach kurzem Aus-

bluten wurde die freie Bauchhöhle eröffnet und die Leber freipräpariert. Für die Leberschnittinkubation wurden Leberstückchen von ca. 2 g entnommen und zur Weiterverarbeitung sofort verwendet (s. 4.2.). Für die Mikrosomeninkubation wurden ebenso Leberstückchen von 1 g entnommen und bei 0° C in 0,25 m Saccharose-lösung bis zur Weiterverarbeitung ca. 5 Minuten aufbewahrt. Zur Eiweißbestimmung wurde je ein weiteres 1 g schweres Leberstückchen ausgewogen und bei -20° C eingefroren.

4.2. Durchführung der Leberschnittinkubationen

Leberstücke von ca. 2 g wurden zwischen einer Glasplatte und einem Objektträger fixiert und mit einer Rasierklinge entlang der Objektträgerkante in ca. 0.2 mm dicke Scheibchen geschnitten. Pro Versuchsansatz wurden 100 ± 5 mg Leberschnitte ausgewogen.

Die Inkubation erfolgte in 25 ml - Weithalserlenmeyerkölbchen in einem Wasserbadinkubator (Fa. Köttermann) bei 37° C. Die einzelnen Kölbchen wurden wie folgt beschickt:

Kolben A: 2.53 ml KHR; 0.47 ml P;
Kolben B: 2.53 ml KHR; 0.47 ml P; 100 mg Leber;
Kolben C: 2.53 ml KHR; 0.47 ml P; 120 μ l SL;
Kolben D: 2.53 ml KHR; 0.47 ml P; 100 mg Leber;
120 μ l SL.

Zusammensetzung der Stammlösungen KHR, P und SL: s. Tab. 2.

Der Start der Inkubation erfolgte durch Einbringen der Leberschnitte.

Da die Substratreduktion in der Zeiteinheit nicht linear abläuft, wurde zunächst 30, 60 und 120 Minuten lang inkubiert. Durch diese Versuchsanordnung konnte diejenige Inkubationszeit festgelegt werden, bei der unter den genannten Bedingungen ein maximaler Substratumsatz durch Lebergewebe unbehandelter Versuchstiere erreicht wurde. Dabei zeigte sich, daß die günstigste Inkubationszeit bei 60 Minuten lag (s. Abb. 7). Alle späteren Versuche wurden mit dieser Inkubationszeit durchgeführt.

Nach beendeter Inkubation wurde der Inhalt der Inkubationskölbchen in Schliffzentrifugengläser überführt. Zur Extraktion der Steroide wurden sofort 6 ml

gekühltes Dichlormethan zugegeben und 3 Minuten lang geschüttelt. Das Gemisch wurde sodann bei 2.500 Rpm 10 Minuten zentrifugiert und teilte sich dabei in eine wässrige Phase, eine schmale Schicht fester Bestandteile (denaturiertes Protein, Lipide etc.) und eine untere Dichlormethanphase. Diese untere Phase enthielt die gelösten Steroidmetaboliten. Sie wurde mit einer Kapillarpipette abgesaugt und in eine Eprovette überführt. Mit dem im Schliffzentrifugengläse verbliebenen Rest wurde der Extraktionsvorgang wiederholt. Die vereinigten Dichlormethanphasen (insgesamt 12 ml) wurden zur spektralphotometrischen Messung (s.u.) und zur weiteren analytischen Aufarbeitung verwendet.

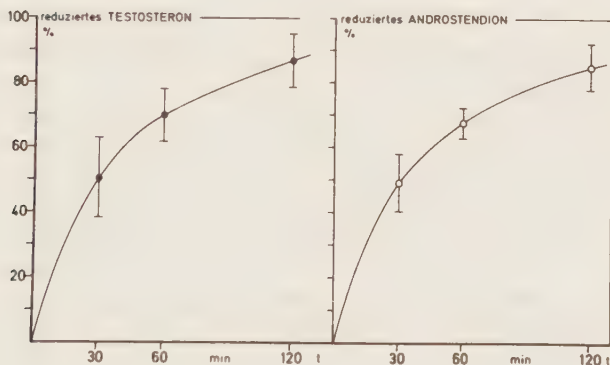


Abb. 7: Inkubation von Leberschnitten unbehandelter Ratten in Testosteron und Androstendion
(N = je 6)

Testosteroninkubation:

Substratumsatz nach 30 min.: $50.4 \pm 12.4 \%$
nach 60 min.: $69.8 \pm 8.2 \%$
nach 120 min.: $86.7 \pm 8.3 \%$

Androstendioninkubation:

Substratumsatz nach 30 min.: $49.3 \pm 8.8 \%$
nach 60 min.: $67.6 \pm 4.8 \%$
nach 120 min.: $85.2 \pm 7.0 \%$

Tabelle 2:

Stammlösungen zur Leberschnittinkubation

1) Krebs - Henseleit - Ringer - Lösung (KHR)

0.154 n	NaCl	-	1,000 ml	(9.00 g/l)
0.154 n	KCl	-	40 ml	(11.49 g/l)
0.110 n	CaCl ₂	-	15 ml	(12.20 g/l)
0.154 n	MgSO ₄	-	10 ml	(38.00 g/l)
	H ₂ O	-	15 ml	
				1,080 ml KHR (ca. 400 Ansätze)

2) Phosphatpuffer (P)

	Na ₂ HPO ₄	-	17.80 g/l
+ 1 n	HCl	-	20 ml
+	H ₂ O	-	ad 1,000 ml (ca. 2,000 Ans.)

3) Substratlösung (SL) (ca. 8 Ansätze)

1 mg Androstendion bzw. Testosteron wurde in 1 ml Methanol gelöst, mit 1 ml aqua bidest aufgefüllt und das Methanol vorsichtig abgedampft. Zur Vermeidung einer Auskristallisierung wurde die nunmehr wässrige Steroidlösung bis zur weiteren Verwendung bei 37° C im Wasserbad aufbewahrt.

0.12 ml dieser Lösung enthielten ca.

120 /_{ug} Steroid.

4.3. Durchführung der Mikrosomeninkubationen mit NADP - generierendem System

Zur Präparation einer Mikrosomensuspension wurde ein Leberstück von 1 g mit einem Ultra - Turrax - Gerät (Fa. Janke & Kunkel KG) in 4 ml einer eisgekühlten 0.25 m Saccharose - Lösung im Eiswasserbad 3 x 15 sec. homogenisiert und 20 min. bei 0° C und 10,000 x g zentrifugiert (Sorvall, RC - 2). Das Sediment wurde verworfen. Der Überstand enthielt Cytoplasma- und Mikrosomenfraktion und wurde in Polyallomer - Zentrifugenröhrchen überführt, mit eisgekühlter 0.25 m Saccharose - Lösung aufgefüllt, austariert und 60 min. mit 105,000 x g bei 0° C zentrifugiert (Ultrazentrifuge Beckman Spinco, Modell L - 2). Der Überstand wurde verworfen (Cytoplasmafraktion). Das Sediment, das die mikrosomale Fraktion enthielt, wurde zum Auswaschen von Cytoplasmaresten mit eisgekühlter Saccharose - Lösung aufgerührt und mit dem Teflon - Homogenisator vorsichtig homogenisiert. Mit dem Homogenat wurde der Sedimentationsvorgang ein zweites Mal wiederholt und die Mikrosomenfraktion in 4 ml Saccharose - Lösung suspendiert. 1 ml dieser Suspension enthielt die Mikrosomenfraktion von 250 mg Lebergewebe.

Die Inkubation erfolgte in Schliffzentrifugenröhrchen in einem Wasserbadinkubator (Fa. Köttermann) bei 37° C. Die einzelnen Röhrchen wurden wie folgt beschickt:

Röhrchen A: 0.133 ml RM;
Röhrchen B: 0.133 ml RM; 0.2 ml Mikros.-Susp.;
Röhrchen C: 0.133 ml RM; 120 µl SL;
Röhrchen D: 0.133 ml RM; 0.2 ml Mikros.-Susp.;
120 µl SL;

Reaktionsmischung RM siehe Tabelle 3.

Substratlösung SL siehe Tabelle 2.

Der Start der Inkubation erfolgte durch Einbringen der Mikrosomensuspension.

Nach Beendigung der Inkubation wurden 2 ml aqua bidest. einpipettiert und die Steroidmetaboliten wie unter 4.2. mit Dichlormethan extrahiert.

Tabelle 3 :

Stammlösungen zur Mikrosomeninkubation

1) Glucose-6-Phosphat-Lösung, 0.18 m (1 Ansatz M)

G-6-P- Na_2	-	0.547 g
Mol.-Gew.		
H_2O	- ad	10 ml

2) Tris - Puffer, 1.0 m (ca. 200 Ansätze M)

Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	-	12.1144 g
Mol.-Gew. 121.144		
H_2O	- ad	100 ml

3) Magnesiumchloridlösung, 0.1 m (ca. 40 Ansätze M)

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	-	2.0333 g
Mol.-Gew. 203.33		
H_2O	- ad	100 ml

4) NADP - Coenzymlösung, 0.00525 m (1 Ansatz RM)

NADP- Na_2	-	4.14 mg
Mol.-Gew. 787		
H_2O	- ad	1 ml

5) G-6-P-Dehydrogenaselösung (2 Ansätze RM)

G-6-P-DH (5 mg/ml)	-	25 μl
H_2O	- ad	500 μl

6) Inkubationsmischung M (ca. 12 Ansätze RM)

G-6-P- Na_2 , 0.18 m	-	10.0 ml
Tris, 1.0 m	-	0.5 ml
MgCl_2 , 0.1 m	-	2.5 ml

7) Reaktionsmischung RM (12 Ansätze)

M	-	0.780 ml
NADP- Na_2 , 0.00525 m	-	0.576 ml
G-6-P-DH-Lösung	-	0.240 ml

4.4. Spektralphotometrische Messung von Testosteron und Androstendion

Zur Messung der Konzentrationen von Testosteron und Androstendion wurde ein Spektralphotometer (Fa. Zeiss, Modell PMQ II) und Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm (Fa. Netheler & Hinz) verwendet.

Das Absorptionsmaximum von Testosteron und Androstendion wird im ultravioletten Bereich zwischen 238 und 240 nm gefunden. Zur exakten Bestimmung der Absorptionsmaxima wurde sowohl für Testosteron als auch für Androstendion ein Absorptionsdiagramm erstellt. In einer Konzentration von 6 μg Steroid/ml Dichlormethan wurde die Absorption gegen reines Dichlormethan als Blindwert zwischen 225 nm und 250 nm Wellenlänge gemessen (s. Abb. 8)

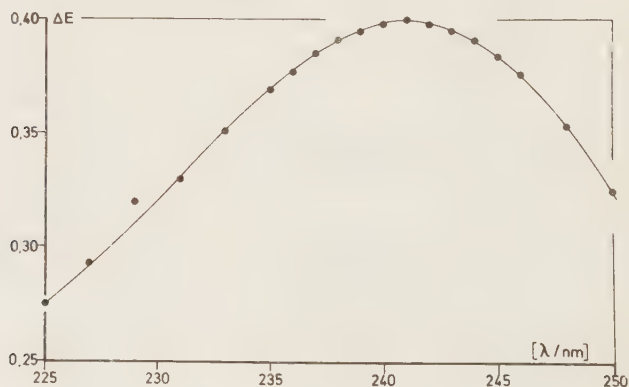


Abb. 8: Absorptionskurve von Testosteron

Spektralphotometrische Messung von Testosteron in Dichlormethan (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gegen Dichlormethan (Blindwert).

$E_{\text{Testosteron}} - E_{\text{Dichlormethan}} = \Delta E$ (Ordinate)
Wellenlänge λ (Abszisse)

$\lambda_{\text{max. Testosteron}} = 241 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{max. Androstendion}} = 240 \text{ nm}$ (nicht abgebildet)

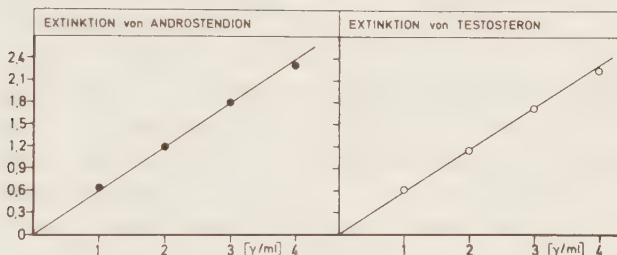


Abb. 9: Eichkurven von Androstendion und Testosteron

Spektralphotometrische Messung von A und T
in Dichlormethan gelöst; Konzentrationen:
1, 2, 3 und 4 µg/ml (Abszisse);
E = Ordinate;

Eichfaktor = reziproker Wert der mittleren
Steigung

$$\text{Eichfaktor} = \frac{\text{Abszisse (Konz. } \mu\text{g/ml)}}{\text{Ordinate (Extinktion)}}$$

Mehrfachbestimmung: N = 21

Eichfaktor_A = 17.3

Eichfaktor_T = 16.7

Die quantitative Messung von Testosteron und Androstendion erforderte die Erstellung einer Eichkurve, aus der der Eichfaktor für jedes Steroid mathematisch ermittelt wurde (s. Abb. 9). Anhand der Eichkurve und der jeweils gemessenen Extinktionswerte konnte nun die Konzentration UV₂₄₀-positiver Substanzen (im Falle der Versuche nichtreduziertes Testosteron und Androstendion) direkt abgelesen werden. Wie im Folgenden angegeben, konnten durch Subtraktion der Extinktions-

werte einzelner Inkubationsansätze Störfaktoren eliminiert und die eingesetzten Steroidmengen genau bestimmt werden:

Meßwert Kölbchen B minus A = unspezifische Extinktion durch Lebergewebe oder Mikrosomen;

Meßwert Kölbchen C minus A = Ext. d. eingesetzten Steroidmenge;

Meßwert Kölbchen D minus B = Ext. d. nach Inkubation noch enthalt. UV-pos. Steroidmenge.

Unter Berücksichtigung des Volumenfaktors, der sich aus der Verdünnung des Meßextraktes ergab, konnte schließlich die Gesamtmenge an nichtreduziertem Steroid errechnet werden. Die Differenz zwischen diesen nichtreduzierten und den jeweils eingesetzten Steroidmengen ergab die Menge an reduziertem Testosteron bzw. Androstendion und war damit gleichzeitig Maßstab für die jeweilige $5\alpha/\beta$ -Reduktase-Aktivität.

4.5. Dünnschichtchromatographische Trennung einzelner C₁₉-Steroide

Nach der Messung der UV - Absorption wurden jeweils 8 ml der die Steroidmetaboliten enthaltenden Dichlormethanphasen am Rotationsverdampfer eingedampft (Rotavapor Büchi). Zu Wiederfindungsmessungen wurden 0.2 ml tritiummarkierten Testosterons (= 50 nCi) zugesetzt. Danach wurden die Proben erneut eingedampft und in 0.5 ml Dichlormethan wieder aufgenommen.

Auf Dünnschichtchromatographie - Platten (MN-Polygram-Folien, 200 x 200 mm, 0,25 mm Kieselgel-SIL G/UV₂₅₄, Fa. Macherey-Nagel & Co.) wurden seitlich Testosteron, Androsteron und Dehydroepiandrosteron aufgetragen (10 Tropfen einer Dichlormethanlösung von ca. 0.5 mg/ml). Dann wurden die in 0.5 ml Dichlormethan gelösten Proben in der Mitte der DC - Platten aufgetragen (s. Abb. 10).

Als Fließmittelsystem diente ein Gemisch von Essigsäureäthylester und Benzol im Verhältnis 3 : 2. Die DC - Platten wurden in die dampfgesättigten Chromatographiekammern eingebracht und im aufsteigenden System 75 min. bei Zimmertemperatur chromatographiert.

Anschließend wurde unter UV - Beleuchtung die Referenzsubstanz Testosteron lokalisiert. Dehydroepiandrosteron und Androsteron konnten durch Besprühen mit einem Gemisch aus 0.5 ml Anisaldehyd, 1.0 ml konz. Schwefelsäure und 50.0 ml Essigsäureäthylester sichtbar gemacht werden, nachdem die Plattenränder mit den Referenzsubstanzen abgeschnitten worden waren. Unter Erwärmung der Plattenränder auf 80 - 90° C bildete sich ein violetter (Dehydroepiandrosteron) bzw. gelber (Androsteron) Farbstoff - Steroid - Komplex. Danach wurde die DC - Platte in zwei Banden

ausgeschnitten: Bande I zwischen Fließmittelgrenze und Dehydroepiandrosteron (Referenzsubstanz) ausschließlich; Bande II zwischen Dehydroepiandrosteron und Testosteron (Referenzsubstanzen) jeweils einschließlich (s. Abb. 11).

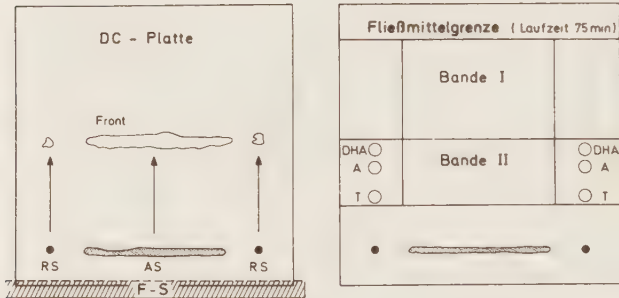


Abb. 10 : Auftragen der Dünnschichtchromatogr.-Platten (links)

Abb. 11 : Auswertung der Dünnschichtchromatogr.-Platten (rechts)

AS = Auftragungsort d. Analysensubst.; FS Fließmittelsystem; RS = Auftragungsort d. Referenzsubst.; A = hier Androsteron, $R_f = 0.32$; DHA = Dehydroepiandrosteron, $R_f = 0.33$; T = Testosteron, $R_f = 0.31$;
 —————> = Systemflußrichtung.

4.6. Gaschromatographische Trennung einzelner C₁₉-Steroide

Die Banden I und II auf den DC - Platten wurden mit einem Metallspatel abgekratzt und mit 3 x 8 ml Methanol eluiert. Das Eluat wurde abfiltriert und eingedampft. Unter einstündiger Bebrütung bei 37⁰ C mit 0.5 ml eines Gemisches von Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan (30 : 1) wurden Trimethylsilylaether gebildet. Der Trockenrückstand dieser Aether wurde in 0.1 ml Hexan gelöst. Jeweils 5 μ l dieses Gemisches wurden auf die Säule injiziert (s.u.). 50 μ l jeder einzelnen Analyse wurden in 10 ml Aquasol zur Radioaktivitätsmessung verwendet.

Gaschromatographiert wurde mit einem Gerät der Fa. Varian (Aerograph Series 2100) auf einer 3 % XE 60 Säule. Die quantitative Auswertung erfolgte mit einem Registriergerät derselben Firma, (Modell 20) mit graphischem Disk-Integrator.

Chromatographiebedingungen:

Injektortemperatur: 230⁰C; Detektortemperatur: 230⁰C;
Säulentemperatur: Initial 190⁰C, nach 14 min. aufgeheizt (Programm: 12⁰C/min.) bis 210⁰C, dann isotherm.

Als Referenzsubstanzen wurden 5 α -Androstan-3 α , 17 β -diol, 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol, Androsteron, Aetiocholanolon, Dehydroepiandrosteron, Testosteron und Androstendion in einer Konzentration von je 1 μ g/5 μ l Hexan silyliert und injiziert. Analysen der Referenzsubstanzen wurden täglich vor Beginn der Messungen durchgeführt (s. Abb. 12).

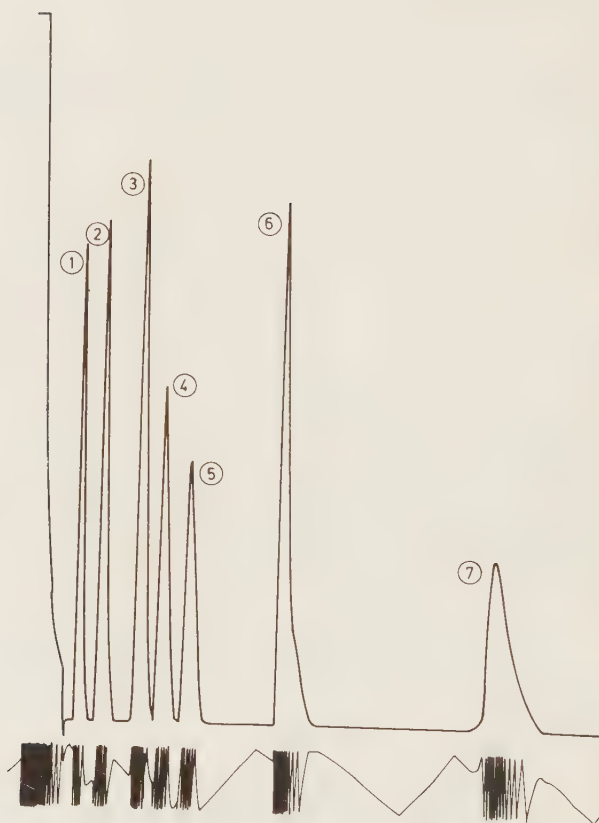


Abb. 12 : Gaschromatographische Auftrennung der Referenzsubstanzen:

- 1 = 5 -Androstan-3 ,17 β -diol,
- 2 = 5 -Androstan-3 β ,17 β -diol,
- 3 = Androsteron,
- 4 = Aetiocholanolon,
- 5 = Dehydroepiandrosteron,
- 6 = Testosteron,
- 7 = Androstendion

4.7. Eiweißbestimmungen

Bei allen Versuchstieren, mit denen Lebermikrosomeninkubationen durchgeführt wurden, wurde der Gesamteiweißgehalt der Lebern bestimmt. Hierzu wurde die Biuret-Methode nach WEICHSELBAUM in einer modifizierten Form verwendet (10). Das Prinzip der Methode basiert auf einer Farbstoffbildung zwischen Eiweiß und Biuretreagens, deren Intensität photometrisch gemessen werden kann.

Ein 1 g schweres Leberstückchen wurde in Saccharoselösung homogenisiert (s. Abschn. 4.3.). 1 ml dieses Homogenates wurde in Wasser gelöst und auf 20 ml aufgefüllt. 0.5 ml dieser Lösung wurden mit der gleichen Menge einer 50 %igen Trichloressigsäure versetzt. Dabei fiel das in der Homogenatlösung enthaltene Eiweiß aus, das anschließend durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 4,000 Rpm sedimentierte. Der Überstand wurde dekantiert und mit 2.5 ml einer standardisierten Biuretlösung (Faktor = 8.75) 30 min. lang mit einem Magnetrührer aufgerührt. Nach Zugabe von 2.5 ml aqua bidest. und weiterem Rühren über die Dauer von 10 min. erfolgte die photometrische Messung bei 564 nm. Zur Eliminierung von Trübungsfehlern wurde eine Spatelspitze Kaliumcyanid zugegeben, die die Blautönung des Biuret-Eiweiß-Komplexes entfärbte und abermals photometrisch gemessen. Aus der Extinktionsdifferenz zwischen Probe mit blauem Biuret-Eiweiß-Komplex und entfärbter Probe und einem gleichartig bestimmten Leerwert wurde eine Maßzahl für die Menge Eiweiß pro ml Homogenatlösung berechnet. Die standardisierte Biuretlösung war in ihrer Konzentration so beschaffen, daß sie mit einer Eiweißlösung von 1 mg/ml einen Biuret-Eiweiß-Komplex mit einem Extinktionswert von 8.75 bildete. Mit diesem Faktor $F = 8.75$ ließen sich die Eiweißmengen der Proben in mg/ml ausdrücken:

$$(E_P - E_{P+KCN}) - (E_L - E_{L+KCN}) \times F = \text{Eiweiß mg/ml}$$

E = Extinktion; P = Probe; L = Leerwert.

4.8. Mathematisch - statistische Auswertung

Die mathematisch - statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Anwendung der STUDENT - Verteilung oder t - Verteilung (STUDENT ist das Pseudonym von W.S. GOSSET, 1876 - 1937, der diese Verteilung zuerst beschrieb und anwendete).

Die t - Verteilung gehört mit der χ^2 - Verteilung und der F - Verteilung zu den drei wichtigsten statistischen Tests. Sie findet als Verteilungsgesetz kleiner Stichproben zur Unterscheidung zweier Mittelwerte Verwendung. Die t - Verteilung kommt der Normalverteilung am nächsten. Sie ist wie diese stetig, symmetrisch, glockenförmig, mit einem Variationsbereich von $-\infty$ bis $+\infty$ jedoch vom arithmetischen Mittel der Grundgesamtheit und deren Standardabweichung unabhängig. Die Form der t - Verteilungskurve wird von den Freiheitsgraden n bestimmt ($n = N - 1$). Werden die Freiheitsgrade kleiner, so differiert die t - Verteilungskurve von der Normalverteilungskurve durch Abflachung und damit durch Verschiebung der Wahrscheinlichkeit vom zentralen in den peripheren Kurventeil. Mit diesen Tests sollen Signifikanzen berechnet werden, die statistisch den Unterschied zweier Kollektivmerkmale sichern können. Ausgangspunkte der Berechnung sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Der Mittelwert $\bar{x}$ eines Kollektivs errechnet sich als Quotient aus der Summe aller Einzelwerte x_N dividiert durch deren Gesamtzahl N :

$$(1) \quad \bar{x} = \frac{1}{N} \sum (x_1, x_2, x_3, \dots)$$

Die Standardabweichung s gibt die Grenze an, innerhalb derer bei mehrfacher Wiederholung und unter biologischer Streuung die erzielten Resultate zu erwarten sind.

Die Standardabweichung als mittlere quadratische Abweichung vom Mittelwert wird berechnet:

$$(2) \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Die Zahl t , die bei der STUDENT-Verteilung zur Ermittlung der Wahrscheinlichkeit P dient, errechnet sich aus der Differenz der Mittelwerte zweier Stichproben und der Standardabweichung s_D dieser Mittelwertdifferenz:

$$(3) \quad t = \frac{\bar{x} - \bar{x}'}{s_D}$$

Die Standardabweichung der Mittelwertdifferenz s_D errechnet sich aus der Quadratwurzel der Summe aus den Streuungen s_x^2 und $s_{x'}^2$, der Mittelwert $\bar{x}$ und $\bar{x}'$.

Die Streuung s_x^2 ist die Standardabweichung s_x im Quadrat:

$$(4) \quad s_D = \sqrt{s_x^2 + s_{x'}^2}$$

Die Signifikanz wird durch die Wahrscheinlichkeit P ausgedrückt, mit der Einzelwerte eines Kollektivs innerhalb der Verteilungskurve eines verglichenen Kollektivs zu erwarten sind. War beim Vergleich zweier Versuchstierkollektive $P < 0.05$, d.h. lagen mit mehr als 95 %iger statistischer Sicherheit Einzelwerte des einen Kollektivs außerhalb der Verteilungskurve des anderen, so wurde der gemessene Merkmalsunterschied als signifikant bezeichnet.

Die tabellarische Auffindung der Wahrscheinlichkeit P erfolgte in einer Tabelle für die STUDENT - Verteilung (siehe Wissenschaftliche Tabellen, Geigy, 7. Aufl. 1968).

5. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

5.1. Verhalten der Tiergewichte unter Versuchsbedingungen

Alle Versuchstiere hatten zu Versuchsbeginn ein Körpergewicht von ca. 180 - 200 g. Da die Phalloidin- und Tetrachlorkohlenstoffvorbehandlung maximal 12 Stunden in Anspruch nahmen, waren bei den Versuchstieren dieser Gruppe wie auch bei den Kontrollen keine signifikanten Gewichtsveränderungen feststellbar. Anders verhielten sich die mit Alkohol vorbehandelten Versuchstiere, die über maximal zehn Wochen den Versuchsbedingungen unterzogen wurden. Die wöchentliche Wägung dieser Versuchstiere ergab zunächst nach einer Woche einen Gewichtsverlust von 190 ± 10 g auf 171.0 ± 26.5 g. Danach stieg das Körpergewicht wieder auf 211.7 ± 22.2 g an (nach drei Wochen). Die Tiere nahmen nach sechs Wochen auf 298.3 ± 10.0 g und nach zehn Wochen auf 331.3 ± 8.9 g zu. Ratten, die nach acht Wochen Alkoholverbehandlung weitere zwei Wochen lang mit reinem Trinkwasser versorgt wurden, zeigten eine Gewichtszunahme auf 378.0 ± 24.3 g (s. Abb. 13)

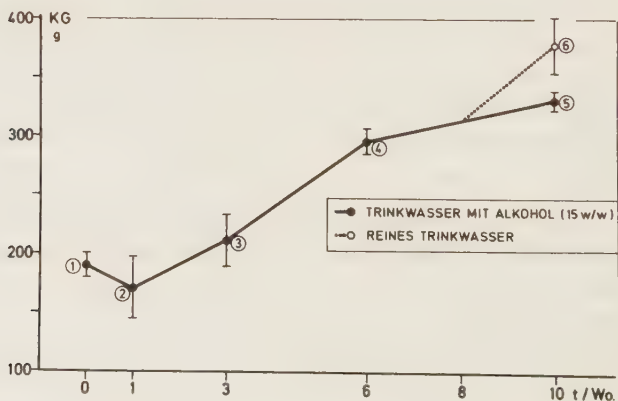


Abb. 13 : Verhalten der Tiergewichte unter Versuchsbedingungen

1: N=12; 2: N=12; 3: N=11; 4: N=4; 5: N=3; 6: N=7

5.2. Eiweißbestimmungen

Der Eiweißgehalt der Leber unbehandelter Ratten betrug 161.3 ± 19.0 mg pro g Frischgewicht. Nach Phalloidin- bzw. Tetrachlorkohlenstoffvorbehandlung ließ sich ein meßbarer Abfall des Eiweißgehaltes auf 141.8 ± 9.2 mg pro g Frischgewicht bzw. 146.2 ± 18.3 mg/g feststellen, der jedoch nicht signifikant war. Vergleichbare, ebenfalls nicht signifikante Ergebnisse wurden nach einer Woche Alkoholvorbehandlung mit 148.2 ± 20.2 mg Eiweiß pro g Frischgewicht gemessen. Nach drei Wochen Alkoholzufuhr stieg die Eiweißkonzentration wieder auf 154.1 ± 29.6 mg/g an, blieb aber immer noch im 2s-Bereich unbehandelter Tiere (s. Abb. 14).

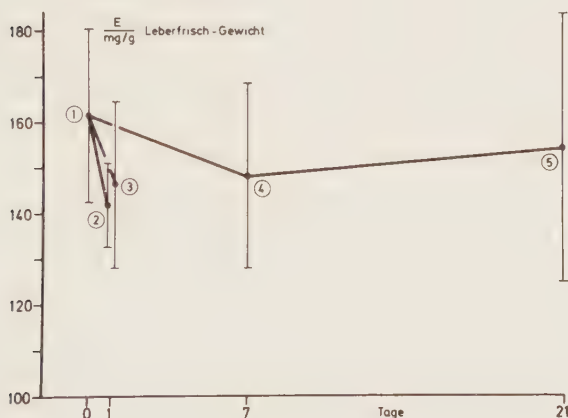


Abb. 14: Verhalten des Gesamteiweiß E der Leber unter Versuchsbedingungen

- 1: Normalkollektiv, N=6; 2: Koll. vorbeh. m. CCl_4 , N=6; 3: Koll. vorbeh. m. Phalloidin, N=4;
4: Koll. vorbeh. m. Alkohol über 1 Woche, N=6;
5: Koll. vorbeh. m. Alkohol über 3 Wochen, N=5.

5.3. Versuche mit Leberschnittinkubation

Unbehandelte Versuchstiere reduzierten Androstendion bzw. Testosteron nach 30 min. zu 49.3 ± 8.9 % bzw. 50.4 ± 12.4 %. Nach 60 min. stiegen die Reduktionsraten auf 67.6 ± 4.8 bzw. 69.8 ± 8.2 %, nach 120 min. auf 85.2 ± 7.1 % bzw. 86.7 ± 8.3 %. Da nach 60 min. Inkubation bereits die nahezu maximalen Substratumsätze bei gleichzeitig noch größtmöglicher Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wurden, waren nach dieser Inkubationszeit veränderte Substratumsatzraten als Ausdruck von Aktivitätsänderungen der $5\alpha/\beta$ -Hydrogenasen am günstigsten zu erfassen.

Drei Stunden nach s.c. Tetrachlorkohlenstoffinjektion waren bereits Enzymaktivitätsverluste der $5\alpha/\beta$ -Hydrogenasen meßbar. Nach zwölfstündiger Einwirkung von Tetrachlorkohlenstoff sank die Reduktionsrate als Maß der Enzymaktivität schließlich signifikant ab. Von der ursprünglich eingesetzten Substratmenge Androstendion wurden nur noch 48.7 ± 5.9 % ($P < 0,0025$), von Testosteron nur noch 43.7 ± 8.7 % ($P < 0,0025$) reduziert (s. Tab. 4 und Abb. 15).

Einmalige Vorbehandlung mit Phalloidin s.c. führte zu ähnlichen Ergebnissen. Bereits drei Stunden nach Injektion lagen die Reduktionsraten um ca. 12 % unter den Reduktionsraten der Kontrolltiere. Nach 12 Stunden Phalloidineinwirkung war die Enzymaktivität gemessen am Substratumsatz ebenfalls signifikant vermindert: Von der ursprünglich eingesetzten Menge Androstendion waren nur noch 48.7 ± 5.9 % ($P < 0,0025$), von der eingesetzten Menge Testosteron nur noch 43.7 ± 8.7 % ($P < 0,0025$) reduziert (s. Tab. 4 u. Abb. 15).

Ein Vergleich der Kollektive zeigt, daß der Abbau von Testosteron nach Phalloidin- und Tetrachlorkohlenstoffvorbehandlung offenbar stärker beeinträchtigt zu

sein scheint als der von Androstendion, ohne daß sich jedoch dafür eine statistische Signifikanz sichern ließe.

Nach oraler Alkoholfuhr sank die indirekt gemessene $5\alpha/\beta$ -Hydrogenaseaktivität kontinuierlich über einen Beobachtungszeitraum von sechs Wochen auf weniger als die Hälfte der Ausgangswerte. Ein deutlicher Enzymaktivitätsverlust ließ sich bereits nach Ablauf einer Woche Alkoholvorbehandlung nachweisen. Die Reduktionsraten sanken um ca. 25 %. Nach dreiwöchiger Alkoholfuhr war die Enzymaktivität der $5\alpha/\beta$ -Hydrogenase signifikant vermindert:

Nach Inkubation mit Androstendion waren 46.3 ± 7.7 % ($P < 0.0025$), nach Inkubation mit Testosteron waren 49.5 ± 12.2 % reduzierten Substrats meßbar ($P < 0.01$). Je länger die Versuche mit dieser Vorbehandlung ausgedehnt wurden, um so deutlicher wurde das Absinken der Reduktionskapazität. Nach sechs Wochen sank die Menge reduzierten Substrats auf 42.8 ± 11.0 % (Androstendion; $P < 0.01$) bzw. 30.3 ± 4.6 % (Testosteron; $P < 0.0025$). Unter Versuchsbedingungen verdoppelten die Versuchstiere ihr Körpergewicht nach etwa zehn Wochen (s. Abb. 13). Auch nach diesem Zeitraum wurde noch eine deutliche Verminderung der Reduktionsaktivität um ca. 8 % gegenüber den Kontrolltieren (Körpergewicht 190 g) nachgewiesen. Im Vergleich dazu konnten sich Versuchstiere, die acht Wochen lang Alkohol im Trinkwasser zugeführt bekommen hatten und weitere zwei Wochen mit reinem Trinkwasser getränkt worden waren, soweit erhalten, daß ein signifikanter Unterschied der Reduktionskapazität gegenüber den Kontrolltieren nicht mehr bestand (s. Tab. 5 u. Abb. 16).

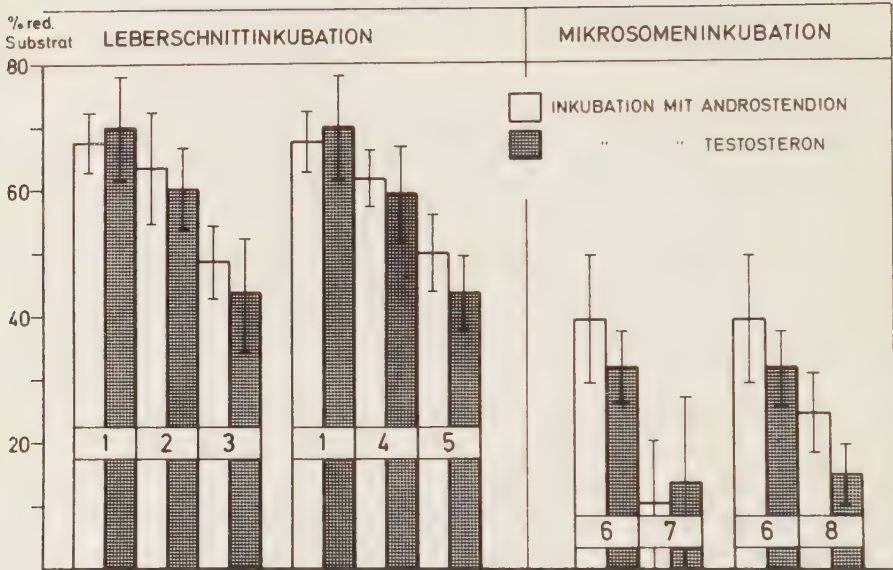


Abb. 15 : Effekt einer einmaligen Injektion von Tetrachlorkohlenstoff bzw. Phalloidin auf die Reduktion von Androstendion und Testosteron

1: Normalkollektiv, N=6; 2: Koll., vorbeh. m. CCl_4 über 3 Std., N=6 ($P < 0.2$); 3: Koll. vorbeh. m. CCl_4 über 12 Std., N=6 ($P < 0.0025$); 4: Koll. vorbeh. m. Phalloidin über 3 Std., N=6 ($P < 0.05$); 5: Koll., vorbeh. m. Phalloidin über 12 Std., N=6 ($P < 0.0025$); 6: Normalkollektiv, N=6; 7: Koll., vorbeh. m. CCl_4 über 12 Std., N=6 ($P < 0.025$); 8: Koll., vorbeh. m. Phalloidin über 12 Std., N=4 ($P < 0.05$)

Auch in der Versuchsreihe mit alkoholvorbehandelten Ratten war die Reduktion von Testosteron in größerem Maße beeinträchtigt als die von Androstendion. Nach Absetzen des Schädigungsfaktors Alkohol stieg die Reduktion von Testosteron stärker an als die von Androstendion (s. Abb. 16).

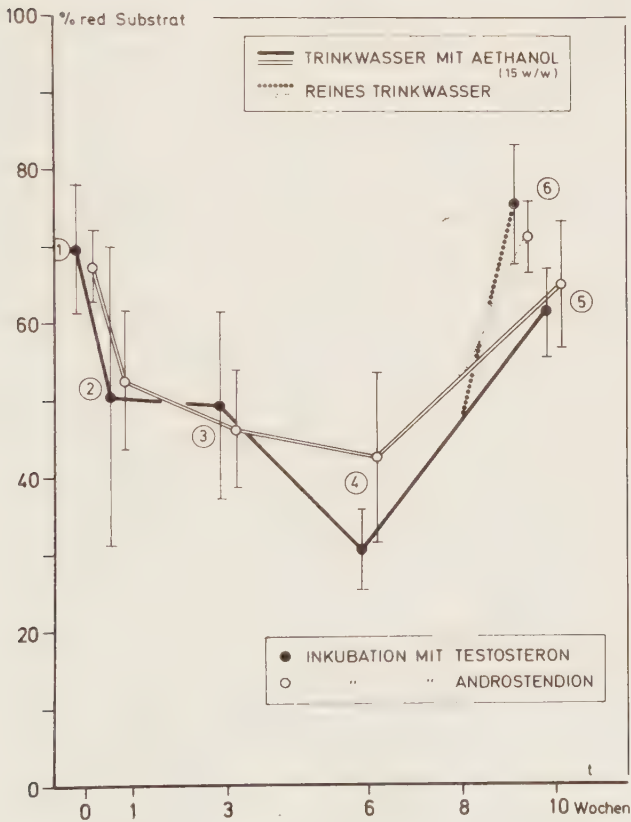


Abb. 16 : Leberschnittinkubation: Effekt kontinuierlicher Alkoholzufuhr im Trinkwasser (15 w/w)
1: N=6; 2: N=6 ($P < 0.05$); 3: N=6, ($P < 0.01$)
4: N=4 ($P < 0.01$); 5: N=3; 6: N=7

Tab. 4: Leberschnittinkubationen: Effekt einer einmaligen Injektion von Tetrachlorkohlenstoff bzw. Phalloidin auf die Reduktion von Androstendion und Testosteron (Angaben in % der reduzierten Substratmenge; N = 6 Tiere)

Substrat	Normaltiere	Tetrachlorkohlenstoff		Phalloidin	
		3 Std.	12 Std.	3 Std.	12 Std.
Androstendion	67.6 ± 4.7	63.5 ± 8.8	48.7 ± 5.9	61.7 ± 4.5	49.9 ± 6.1
Testosteron	69.8 ± 8.2	60.2 ± 6.5	43.7 ± 8.7	59.3 ± 7.5	43.5 ± 5.9

Tab. 5: Leberschnittinkubationen: Effekt oraler kontinuierlicher Alkoholzufuhr auf die Reduktion von Androstendion und Testosteron.

(Angaben in % der reduzierten Substratmenge; N = 3 - 7 Tiere)

Substrat	1 Woche	3 Wochen	6 Wochen	8 Wochen		10 Wochen
				+ 2 Wo. Wasser		
Androstendion	52.9 ± 9.0	46.3 ± 7.7	42.8 ± 11.0	71.2 ± 4.8	65.0 ± 8.7	
Testosteron	50.6 ± 19.4	49.5 ± 12.2	30.3 ± 4.6	75.6 ± 7.9	61.5 ± 5.7	

5.4. Versuche mit Mikrosomeninkubation

Die Inkubation mit mikrosomalen Präparationen von tetrachlorkohlenstoffvorbehandelten Rattenlebern in einem Inkubationsmedium mit NADP generierendem System zeigten vergleichbare Aktivitätsverminderungen der reduzierenden Enzyme wie die Leberschnittinkubationen. Im Inkubationsansatz unbehandelter Tiere waren $39.2 \pm 9.9 \%$ (Androstendion) bzw. $31.7 \pm 5.7 \%$ (Testosteron) der eingesetzten Substratmengen reduziert. Zwölfstündige Vorbehandlung mit Tetrachlorkohlenstoff führte zu einem signifikanten Enzymaktivitätsverlust: Nach Androstendioninkubation waren nur noch $10.3 \pm 10.0 \%$ ($P < 0,0025$), nach Testosteroninkubation noch $13.7 \pm 13.4 \%$ ($P < 0.025$) der eingesetzten Steroide reduziert. Auch nach Vorbehandlung mit Phalloidin über zwölf Stunden wurde eine signifikante Abnahme der Enzymaktivität beobachtet (s. Abb. 15).

Das Verhalten der $5\alpha/\beta$ -Reduktasen alkoholvorbehandelter Versuchstiere unterschied sich bei Mikrosomeninkubation unter Zugabe des NADP generierenden Systems zum Inkubationsmedium grundlegend von dem Verhalten der Reduktasen bei Leberschnittinkubation. Nach einwöchiger Alkoholzufuhr waren Veränderungen der Reduktionsraten unter den Versuchsbedingungen der Mikrosomeninkubation weder für Androstendion noch für Testosteron gegenüber den Kontrollen nachweisbar. Auch nach dreiwöchiger Alkoholzufuhr konnte für keines der beiden Substrate eine Aktivitätsverminderung gemessen werden (s. Tab. 6 u. Abb. 17).

Bei der Inkubation mit Mikrosomenpräparationen von Lebergewebe fiel allerdings eine unterschiedliche Aktivität der Reduktion von Androstendion und Testosteron auf. Bei unbehandelten Versuchstieren wurde Androstendion etwa 20 % mehr reduziert als Testosteron. Nach einwöchiger

Alkoholvorbehandlung stieg dieses Verhältnis weiter zugunsten Androstendion. Es wurden ca. 35 % mehr Androstendion als Testosteron reduziert.

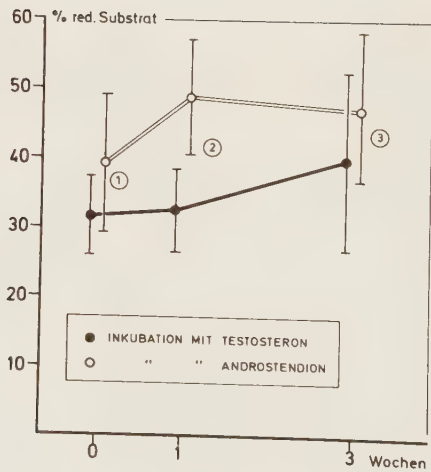


Abb. 17: Lebermikrosomeninkubation: Effekt kontinuierlicher Alkoholzufuhr im Trinkwasser (15 w/w)

1: N = 6;

2: N = 6, ($P < 0.45$);

3: N = 5, ($P < 0.15$).

5.5. Versuch einer Enzyminduktion durch Cortisol

Zwei Stunden nach Cortisolgabe s.c. stieg die Reduktionsrate beider Substrate meßbar um ca. 11 % im Durchschnitt an. Nach Testosteroninkubation von tetrachlorkohlenstoffvorbehandelten Rattenlebern blieb ein Aktivitätsanstieg allerdings aus. Eine statistische Signifikanz ließ sich jedoch nur bei cortisolvorbehandelten Normaltieren nach Inkubation mit Androstendion sowie bei cortisolvorbehandelten Tieren mit Phalloidinintoxikation nach Testosteroninkubation nachweisen. Diese Versuche waren durchgeführt worden, um eine Enzyminduktion der Reduktasen durch Cortisol zu prüfen (s. Tab. 7 u. Abb. 18).

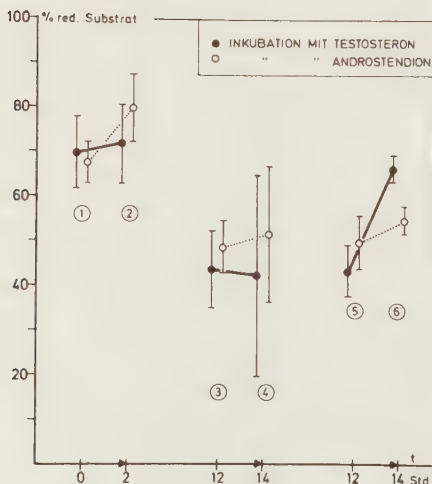


Abb. 18: Leberschnittinkubation: Effekt einer einmaligen Injektion Cortisol (5 mg/kg Körpergewicht)

1: Normalkollektiv, N=6; 2: Normalkoll., vorbeh. m. Cortisol, N=3; 3: Koll. vorbeh. m. CCl₄, N=6; 4: Koll., vorbeh. m. CCl₄ u. Cortisol, N=3; 5: Koll., vorbeh. m. Phalloidin, N=6; 6: Koll., vorbeh. m. Phalloidin u. Cortisol, N=3

5.6. Gaschromatographische Analyse der Inkubationsextrakte

5.6.1. Wiederfindungsmessungen

Zur Berücksichtigung des während des Aufarbeitungsvorganges in Verlust geratenen Steroidanteils und somit zur quantitativen Bestimmung der aus den Substraten Androstendion und Testosteron jeweils gebildeten Metaboliten waren vor den Versuchsreihen Wiederfindungsmessungen durchgeführt worden. Dabei ergab sich nach Einsatz von 50 nCi tritiummarkierten Testosterons zum Inkubationsansatz vor der Inkubation eine Wiederfindung von $34.3 \pm 9.2 \%$ im letzten Eluat, das zur Gaschromatographie gelangte. Sämtliche Meßwerte der einzelnen Versuchsgruppen wurden mit dem Faktor 3 multipliziert.

5.6.2. Beschreibung des Metabolitenmusters

In allen Analysen ließen sich aufgrund der Retentionszeiten der Referenzsubstanzen (s. Abb. 12) Androsteron, Aetiocholanolon sowie mit wenigen Ausnahmen Androstendion und Testosteron nachweisen. Nach Phalloidin-, Tetrachlorkohlenstoff- und sechswöchiger Alkoholvorbehandlung konnte in Inkubationsextrakten in geringen Mengen auch Dehydroepiandrosteron gefunden werden. $5\alpha/\beta$ -Androstan- $3\alpha/\beta,17\beta$ -dirole waren nicht feststellbar. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Empfindlichkeit der Methode die quantitative Bestimmung von Steroidmengen in Konzentrationen von weniger als 6 ng/5 μ l, d.h. etwa 0.1 % der eingesetzten Substratmengen Testosteron bzw. Androstendion nicht mehr zuließ. Bei den untersuchten Kollektiven zeigten sich deutliche quantitative Unterschiede der Metaboliten. Dabei fiel auf, daß nach Leberschnittinkubation - vor allem mit Testosteron als Substrat -

von Lebern unbehandelter Tiere sowie tetrachlorkohlenstoff- und phalloidinvorbehandelter Ratten in überwiegender Menge Androsteron gefunden wurde. Bei Inkubation mit alkoholgeschädigten Lebern hingegen wurde vorwiegend Aetiocholanolon gebildet. Nach Mikrosomeninkubation war in allen Versuchsgruppen Aetiocholanolon das in jeweils größter Menge nachweisbare Steroidhormon. Am deutlichsten war dieser Befund nach Phalloidinintoxikation. Nach experimenteller Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff und Alkohol ließen sich dagegen keine typischen Veränderungen im Verhältnis Androsteron zu Aetiocholanolon nachweisen. Testosteron und Androstendion waren in den Inkubationsextrakten in größter Konzentration wiederzufinden, in die sie jeweils als Substrat eingesetzt wurden. Die nach Gaschromatographie wiedergefundenen Mengen an Testosteron und Androstendion lagen zwischen 0.3 und 22.5 % der eingesetzten Substanzmenge. Die Menge der aus Androstendion und Testosteron gebildeten Metaboliten sind in den Tabellen 8 und 9 im Prozentsatz der eingesetzten Substratmengen zusammengestellt.

5.6.3. Das Verhältnis von Androsteron zu Aetiocholanolon

unter experimenteller Leberschädigung

Androsteron und Aetiocholanolon sind analoge androgene Metaboliten, die sowohl über Androstendion als auch Testosteron entstehen können und sich in stereoisomer α - bzw. β -Stellung des Wasserstoffions am C_5 -Atom unterscheiden. Ihre Bildung wird durch spezifische 5α - bzw. 5β -Reduktasen katalysiert, die intrazellulär unterschiedlich lokalisiert sind. Das Verhältnis der Aktivitäten der 5α - zu 5β -Reduktasen läßt sich indirekt am Quotienten Androsteron/Aetiocholanolon ablesen. Nach

Leberschnittinkubation lag dieser Quotient bei lebergesunden, tetrachlorkohlenstoff- und phalloidinvorbehandelten Tieren über 1.0. Auffallend hoch war der Quotient bei den Kontrolltieren nach Inkubation mit Testosteron.

Eine Erklärung fällt dafür zur Zeit schwer. Bei Tieren mit nichtalkoholischer experimenteller Leberschädigung lagen die Quotienten nach Inkubation mit Testosteron um ein Mehrfaches höher als nach Inkubation mit Androstendion.

Nach Alkoholvorbehandlung dagegen sank das Verhältnis von Androsteron zu Aetiocholanolon auf Werte unter 1.0,

d.h. der Anteil von Androsteron sank ab, während der von Aetiocholanolon zunahm. Daraus kann geschlossen werden, daß offensichtlich Änderungen der Verhältnisse der Aktivitäten von 5α - zu 5β -Reduktasen unter dem Einfluß von Alkohol zustandekommen. Der bei Alkoholtieren niedrige

Androsteron/Aetiocholanolon - Quotient stieg auch nach zehn Wochen kontinuierlicher Alkoholzufuhr nicht wieder an (Tab. 10). Nach Mikrosomeninkubation lagen die

Quotienten sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den lebergeschädigten Tieren unter 1.0. Ein typisches Verhalten für den einen oder anderen Schädigungsmodus ließ sich dabei nicht feststellen. Es bleibt jedoch zu diskutieren, wie sich der Nachweis von Aetiocholanolon nach Mikrosomeninkubation zu der in der Literatur vertretenen Auffassung verhält, daß bislang in Mikrosomenpräparationen keine 5β -Reduktasen gefunden wurden

(24, 47, 83).

Tab. 8 : Leberschnittinkubation: Vergleich der gaschromatographisch nachgewiesenen Androgenmetaboliten Androsteron, Aetiocholanolon und Dehydroepiandrosteron und dem Prozentsatz der im UV - Spektrum nachgewiesenen reduzierten Steroide (Angaben in % der jeweils einges. Substratmenge Testosteron bzw. Androstendion)

Experimentelle Schädigung durch:	Substrat	M e t a b o l i t e n			reduz. Substanz im UV-Spektrum
		Andosteron	Aetiocholanolon	DAH	
CCl ₄ , 12 Std. (N = 6)	A	21.5	11.9	0.8	48.7
	T	30.3	12.7	-	43.7
Phalloidin, 12 Std. (N = 6)	A	15.3	20.7	-	49.9
	T	19.6	11.9	2.5	43.5
Alkohol, 1 Woche (N = 6)	A	13.6	36.9	-	52.9
	T	6.3	42.5	-	50.6
Alkohol, 3 Wochen (N = 6)	A	15.1	18.4	-	46.3
	T	20.3	23.1	-	49.5
Alkohol, 6 Wochen (N = 4)	A	18.2	21.0	-	42.8
	T	16.2	17.2	2.7	30.3
Alkohol, 10 Wochen (N = 3)	A	10.8	64.4	-	65.0
	T	1.9	48.6	-	61.5
Kontrolltiere (N = 6)	A	45.9	15.5	-	67.6
	T	67.6	4.4	-	69.8

A = Androstendion; T = Testosteron; DHA = Dehydroepiandrosteron

Tab. 9 : Mikrosomeninkubation: Vergleich der gaschromatographisch nachgewiesenen Androgenmetaboliten Androsteron, Aetiocholanolon und Dehydroepiandrosteron zum Prozentsatz der im UV - Spektrum nachgewiesenen reduzierten Steroide (Angaben in % der jeweils einges. Substratmenge Testosteron und Androstendion)

Experimentelle Schädigung durch	Substrat	M e t a b o l i t e n			reduz. Substanz im UV-Spektrum
		Androsteron	Aetiocholanolon	DAH	
CCl ₄ , 12 Std. (N = 6)	A	3.6	5.2	-	10.3
	T	3.9	5.0	-	13.7
Phalloidin 12 Std. (N = 4)	A	5.0	14.8	-	24.5
	T	1.9	12.3	0.5	15.0
Alkohol, 1 Woche (N = 6)	A	12.8	29.4	-	48.9
	T	8.7	27.9	-	32.5
Alkohol, 3 Wochen (N = 5)	A	19.3	21.4	-	47.3
	T	14.8	22.4	-	39.8
Kontrolltiere (N = 7)	A	7.4	15.4	-	39.2
	T	12.7	17.2	-	31.7

A = Androstendion; T = Testosteron; DHA = Dehydroepiandrosteron

Tab. 10 : Verhalten des Quotienten $\frac{\text{Androsteron}}{\text{Aetiocholanolon}}$

A) nach Leberschnittinkubation (N = 3 - 7)

B) nach Mikrosomeninkubation (N = 5 - 7)

(A = Andronstendion; T = Testosteron)

Experimentelle Leberschädigung durch	Substrat	Quotient $\frac{\text{Androsteron}}{\text{Aetiocholanolon}}$	
		A)	B)
CCl ₄ , 12 Std.	A	1.8	0.7
	T	2.4	0.8
Phalloidin, 12 Std.	A	0.7	0.3
	T	1.6	0.2
Alkohol, 1 Woche	A	0.4	0.4
	T	0.1	0.3
Alkohol, 3 Wochen	A	0.8	0.9
	T	0.9	0.7
Alkohol, 6 Wochen	A	0.9	
	T	0.9	
Alkohol, 10 Wochen	A	0.2	
	T	0.1	
Kontrollen	A	3.0	0.5
	T	15.4	0.7

6. DISKUSSION

6.1. Einfluß der toxischen Leberschädigung auf Körpergewicht und makroskopische Organbefunde der Versuchstiere

Tetrachlorkohlenstoff-, Phalloidin- und Aethanolapplikation hatten sowohl auf das Körpergewicht als auch auf den makroskopischen Leberbefund der Versuchstiere unterschiedliche Wirkung.

Nach Phalloidininjektion in der von uns verwendeten Einzeldosis von 5 ml/kg Körpergewicht überlebten zwar die Versuchstiere die Versuchszeit von zwölf Stunden, zeigten aber makroskopisch Leberveränderungen, die dem Bild einer beginnenden-akuten gelben Leberdystrophie entsprachen. Entsprechende Beobachtungen liegen über amanita - phalloides - Vergiftungen beim Menschen vor (6, 7). Bei den beschriebenen meist letal verlaufenen Fällen entwickelte sich eine hochgradige Verfettung mit Leberzellnekrosen. Vergiftungen, die überlebt wurden, zeigten in Leberstanzzyclindern vom 36. Tag nach Intoxikation keine frischen Leberzelluntergänge, aber feintropfige zentrale Verfettung und infiltrierte periportale Felder. Bei unseren nach zwölf Stunden dekapitierten Versuchstieren waren die Lebern sichtbar vergrößert, konsistenzvermehrte und von ockergelber Farbe.

Die pathologisch- anatomischen Veränderungen an Lebern nach Tetrachlorkohlenstoffintoxikation zeichnen sich durch Verfettung und zentrilobuläre Nekrosen aus. Dementsprechend waren die Lebern der Versuchstiere zwölf Stunden nach Tetrachlorkohlenstoffapplikation leicht vergrößert und von gelblichem Farbton.

Auch über die Entwicklung alkoholischer Leberschädigungen sind bereits zahlreiche Befunde mitgeteilt (Übersicht bei v. OLDERSHAUSEN, 50). Der Grad der toxischen Leberverfettung ist dosisabhängig. Deshalb fällt bei chronischer Intoxikation die Fettleber in besonders ausgeprägtem Maße auf. Degenerative Prozesse des Lebergewebes beginnen mit dem Auftreten von Einzelzellnekrosen. Durch Bindegewebsvermehrung und atypische Regeneration geht die noch reversible Schädigung der Fettleber in die irreversible Leberzirrhose über. Bei den Versuchstieren konnte nach acht bzw. zehn Wochen Alkoholzufuhr nur in einzelnen Fällen der makroskopische Befund einer beginnenden Zirrhose in Form einer feinhöckrigen Oberfläche erhoben werden. Die übrigen Rattenlebern zeigten drei Wochen nach Alkoholvorbehandlung eine Größenzunahme mit gelbbrauner Farbveränderung sowie in Einzelfällen hämorrhagische Injektion, die als Stauungszeichen aufzufassen sind.

Das Gewichtsverhalten wurde nach Phalloidin- und Tetrachlorkohlenstoffvorbehandlung aufgrund der kurzen Versuchsdauer nicht beeinflusst. Während zehnwöchiger kontinuierlicher Alkoholzufuhr nahmen die Versuchstiere innerhalb der ersten Woche deutlich an Gewicht ab, um nach drei Wochen wieder zuzunehmen (s. Abb. 13).

6.2 Wirksamkeit und Mechanismus toxischer Leberschädigung auf die 4-en-5-Reduktion von Testosteron und Androstendion

a) nach Tetrachlorkohlenstoff

Die in Einzelbefunden beschriebene experimentelle Tetrachlorkohlenstoffintoxikation führt bei der Ratte zu einer signifikanten Hemmung der 4-en-5-Reduktaseaktivität in Leberschnitten und Mikrosomenpräparationen. Die Befunde entsprechen damit den Ergebnissen von BEARY (3), der nach oraler Verabreichung von in Mineralöl gelöstem Tetrachlorkohlenstoff ebenfalls eine stark eingeschränkte Abbaurate von Testosteron und Androstendion fand.

Auffällig war, daß der Abfall der Enzymaktivität der 4-en-5-Reduktase nach Inkubation mit Mikrosomenfraktionen geschädigter Lebern prozentual wesentlich höher lag, als nach Inkubation mit Leberschnitten. Aus dieser Beobachtung und der Kenntnis der Pathophysiologie der Tetrachlorkohlenstoffintoxikation ist anzunehmen, daß hier eine direkte Einwirkung auf mikrosomale Strukturen - insbesondere die dort lokalisierten Enzyme vorliegt. SLATER, KRÖNER u. Mitarb. (36, 37, 70) stützen diese Auffassung, indem sie an Rattenlebern nachweisen konnten, daß mikrosomale Enzyme - speziell die Glucose-6-Phosphatase - in ihrer Aktivität stark absinken. Lysosomale Enzymaktivitäten hingegen blieben nach CCl_4 -Intoxikation unverändert; Enzyme, die nach Leberschädigung im Serum vermehrt nachweisbar sind, waren nach CCl_4 -Intoxikation erhöht, was gegen Membranschädigung als alleinige Ursache für Enzymerhöhungen im Serum nach Leberzellschädigungen spricht. Der in den erwähnten

Arbeiten beschriebene Aktivitätsabfall mikrosomaler Enzyme wird durch einen direkten Angriff von Abbauprodukten des Tetrachlorkohlenstoffs an den Mikrosomen erklärt. Weiterhin konnten KRÖNER und STAIB (37) mit Hilfe von Proteinbestimmungen in verschiedenen Organen CCl_4 -vorbehandelter Ratten einen meßbaren Proteinschwund nachweisen, der bei intakter RNA-Synthese auf anderweitige Proteinsynthesestörungen zurückzuführen ist. Auch diese Befunde werden als Folge einer primären Mikrosomenveränderung diskutiert. Es bedarf der weiteren Klärung, ob der in unseren Versuchen beobachtete Schwund mikrosomaler Enzyme einer gestörten Enzymproteinsynthese oder Folge von Strukturalterationen der Mikrosomen ist.

Unsere Annahme einer direkten mikrosomalen Enzymschädigung findet weitere Unterstützung in der Beobachtung, daß der Quotient Androsteron/Aetiocholanolon bei tetrachlorkohlenstoffgeschädigten Tieren sowohl nach Inkubation mit Testosteron als auch mit Androstendion absinkt. Diese Veränderung in der Relation der beiden Metaboliten ist nur zu erklären, wenn diese Metaboliten an verschiedenen intrazellulären Orten und über den Einfluß verschiedener spezifischer Enzyme entstehen und der Schädigungsfaktor unterschiedlich auf die einzelnen Zellstrukturen einwirkt. Da Androsteron unter dem Einfluß einer spezifischen in die α -Konfiguration umwandelnden 4-en-5-Reduktase entsteht, und dieses Enzym bislang nur in mikrosomalen Strukturen nachgewiesen werden konnte, stützt auch dieser Befund unsere Annahme einer direkten mikrosomalen Enzymschädigung.

Verschiedene Autoren haben aufgrund morphologischer Befunde wie Vaginalsmear, Uterusgewicht und Körperwasservermehrung bei Mäusen nach experimenteller CCl_4 -Vergiftung auf eine verminderte Inaktivierung der Östrogene geschlossen. Bei diesen Experimenten kann ein analoger Schädigungsmechanismus angenommen werden (53, 55, 87).

b) nach Phalloidin

Unter dem Einfluß von Phalloidin konnten Enzymaktivitätsänderungen der 4-en-5-Hydrogenasen beobachtet werden, die im Prinzip den Änderungen nach Tetrachlorkohlenstoffbehandlung glichen. So war sowohl nach Mikrosomeninkubation mit NADP-generierendem System als auch nach Schnittinkubationen eine signifikante Verminderung der Abbaurate von Testosteron und Androstendion zu beobachten. Diese Befunde sprachen ebenso wie die Ergebnisse nach Vorbehandlung mit CCl_4 für eine direkte Enzymproteinschädigung. Da die durchgeführten Versuche zunächst nicht über längere Zeiträume durchgeführt wurden (maximal bis zu zwölf Stunden nach Applikation von Phalloidin) läßt sich eine sichere Aussage über die Reversibilität der Schädigung nicht machen. Es ist jedoch anzunehmen, daß die Veränderungen wie auch im Falle der CCl_4 -Intoxikation dosisabhängig reversibel sind.

Wie eine Enzymschädigung durch Phalloidin im Einzelnen zustandekommt, ist zur Zeit noch Gegenstand der Diskussion. ESSLINGER beschreibt als wesentliche intrazelluläre Veränderung einen starken Schwund zelleigener energiereicher Phosphate, vor allem ATP und NAD^+ (23). Dieser excessive Phosphatmangel soll zu einem vollständigen Zusammenbruch des zellulären Energiehaushaltes führen. Diese Theorie würde erklären, daß auch trotz Zugabe eines im Überschuß NADP-generierenden Systems keine Beeinflussung der 4-en-5-Hydrogenaseaktivität erreicht wird. Ausführliche Untersuchungen zum Mechanismus der Phalloidinschädigung von WIELAND, BOCK u. Mitarb. (6, 86, 87) machen verständlich, warum ein Ersatz des fehlenden Coenzyms allein nicht ausreicht, um intakte zelluläre Funktionen

wiederherzustellen. So konnte gezeigt werden, daß außerdem eine extreme Glykogenverarmung des Lebergewebes auftritt. Der Ausstrom von Glykogen aus der Zelle führt zu einer passageren Hyperglykämie mit nachfolgender Hypoglykämie und Schocksymptomatik, die sich auch durch reichliche Zufuhr von Glucose nicht beherrschen läßt. Dazu findet sich eine erhebliche Hypoproteinämie mit Verschiebung der elektrophoretisch trennbaren Eiweißfraktionen und einer absoluten Vermehrung der Gammaglobuline (1, 7).

c) nach Äthylalkohol

Besondere, mit der Schädigung durch Tetrachlorkohlenstoff und Phalloidin nicht vergleichbare Veränderungen des Androgenabbaus ließen sich nach alkoholischer Leberschädigung beobachten. Unter oraler kontinuierlicher Alkoholfuhr sank die Aktivität der 4-en-5-Reduktasen über einen Beobachtungszeitraum von sechs Wochen stetig ab; nach Aussetzen der Alkoholfuhr und weiterer Trinkwasserzufuhr war diese Verminderung der Enzymaktivität voll reversibel.

Dieses Verhalten der Enzymaktivität erscheint nicht mit der Vorstellung einer direkten Enzymproteinschädigung vereinbar. Eine direkte Enzymproteinschädigung scheint auch deshalb nicht vorzuliegen, weil in Versuchsreihen mit Mikrosomenpräparationen geschädigten Lebergewebes unter Zugabe eines Coenzymgenerierenden Systems keine Verminderung der Enzymaktivität der 4-en-5-Hydrogenasen nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtungen sprechen eher für eine "indirekte Enzymschädigung" durch einen Mangel an reaktionsfähigem Coenzym. Ähnliche Mechanismen der Enzymhemmung sind vom Hungertier und vom alloxandiabetischen Tier sowie nach Verabreichung von Menadion bekannt.

Über den Stoffwechsel von Äthanol und dessen Wirkung auf die Morphologie und zahlreiche biochemische Vorgänge der Leberzellen liegen bereits Untersuchungen vor, die unsere Beobachtungen einer Störung des Androgenstoffwechsels verständlich machen. Äthanol wird vorwiegend in der Leber abgebaut. Die Oxydation erfolgt über Acetaldehyd zu Acetat. Die NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase (ADH), die die Reaktion Äthanol $\rightarrow$ Acetaldehyd katalysiert, bestimmt die Geschwindig-

keit der Äthanoloxydation (13). Pro Molekül Alkohol werden zwei Moleküle NADH gebildet bzw. zwei Moleküle NAD verbraucht. Die Aktivität der ADH steigt mit zunehmendem Alter an. Unter Äthanolzufuhr steigt die ADH-Aktivität und damit der Verbrauch an NAD bei normalen und eiweißarm ernährten Tieren initial ebenfalls deutlich an. Nach Alkoholfzufuhr über drei Wochen und längere Zeit fällt die ADH-Aktivität jedoch wieder ab, um bei normal ernährten Tieren Werte unbehandelter Versuchstiere zu erreichen. Bei eiweißarmer Ernährung ist der Aktivitätsabfall der ADH hingegen stärker (8). Wenn man annimmt, daß Alkohol eine toxische Wirkung auf die Leberzelle hat, und bei proteinarmer Ernährung der Alkoholabbau durch eine verminderte ADH-Aktivität verzögert ist, wäre zusammen mit der verminderten ADH-Aktivität auch ein verminderter Verbrauch an NAD Folge der Äthanolwirkung. Ein derartiges Verhalten mit verlangsamter Alkoholoxydation aufgrund eines verminderten Reduktionsgrades des zellulären NAD wird auch nach längerem Fasten diskutiert.

Die Kenntnis dieser Zusammenhänge spricht für die Annahme einer indirekten coenzymbedingten Hemmung der 4-en-5-Reduktasen unter dem Einfluß von Äthanol. Dabei ist es möglich, daß trotz eines raschen Anstiegs an reduziertem NAD sowohl im zytoplasmatischen Raum als auch in den Mitochondrien nach Äthanolzufuhr am Ort des Verbrauchs nicht ausreichend reaktionsfähiges Coenzym für die 4-en-5-Reduktion zur Verfügung steht. Der Mangel an Coenzym führt dann zu einer Anhäufung von Substrat (in unserem Falle Testosteron bzw. Androstendion). SMITH, NEWMAN sowie BODE u. Mitarb. (9, 72, 71) haben in experimentellen Untersuchungen an Mäuse- und Rattenlebern zeigen können, daß sowohl

in vivo als auch in vitro unter dem Einfluß von Äthanol ein rascher Anstieg des Reduktionszustandes des cytoplasmatischen und des mitochondrialen NAD-Systems erfolgt. Dauert die Alkoholzufuhr länger an, bleibt der Reduktionszustand des NAD-Systems im cytoplasmatischen Raum jedoch konstant, steigt aber im mitochondrialen-Raum weiter an. Dieser Effekt wird so erklärt, daß ein Wasserstofftransport mittels Substraten durch die in der Regel für NADH undurchlässige Mitochondrienmembran stattfindet. Diese Vorgänge führen sowohl zu einem Anstieg des Quotienten NADH/NAD unter Äthanolzufuhr als auch wahrscheinlich zu einer intrazellulären Verteilungsstörung des im Wesentlichen proteingebundenen NAD. Es wäre daher verständlich, daß sowohl in cytoplasmatischen als auch in mikrosomalen Zellstrukturen, in denen die androgen-inaktivierenden Enzyme lokalisiert worden sind, nach Äthanolzufuhr ein Mangel an reduziertem NADH herrscht (siehe auch Abb. 6).

Die gaschromatographischen Bestimmungen der Metaboliten Androsteron und Ätiocholanolon nach Leberschnittinkubation zeigten, daß unter Alkoholeinfluß das Verhältnis von 5α - zu 5β -Reduktion zugunsten der 5β -Metaboliten verschoben ist. Diese Tendenz blieb auch über mehrere Wochen Alkoholzufuhr erhalten, ohne daß sich das Verhältnis wieder normalisierte. Aus Untersuchungen von TELLER (80) ist bekannt, daß sich der Quotient von Androsteron zu Ätiocholanolon einerseits geschlechtsspezifisch, andererseits in Beziehung zum Lebensalter und der jeweiligen Entwicklungsperiode verändert. Bei männlichen Kleinkindern wurde ein Quotient von 0.6 ± 0.17 (Untersuchung der Metaboliten im Urin) gefunden. In der Pubertät stieg das Verhältnis auf 1.06 ± 0.36 an. Im Erwachsenenalter fand sich

dann wieder ein Quotient von 0.55 ± 0.29 . Auch bei Patienten mit Hypogonadismus wurde ein niedriger Quotient von 0.2 bis 0.4 nachgewiesen, der in allen Altersstufen gleichblieb. Die Ursache dieser Änderung des Quotienten Androsteron/Ätiocholanolon wird in einer Substratinduktion der 5α -Reduktasen durch die gesteigerte Produktionsrate von Testosteron und Androstendion während der Pubertät vermutet. Welche Bedeutung sich aus dieser Verschiebung der Relationen für die physiologische Entwicklung ergibt, ist zur Zeit noch ungeklärt. Von Interesse wäre dabei vor allem, ob diese Veränderungen Einflüsse auf die anabole Situation haben. Wenn das der Fall wäre, würde die Beeinflussung dieses Quotienten unter Alkoholzufuhr möglicherweise auch Konsequenzen für den Eiweißstoffwechsel haben.

6.3. Beeinflussung von Steroid-4-en-5-Reduktase durch Pharmaka, Nahrungskarenz, experimentellen Diabetes mellitus und experimentelle arterielle Hypertonie

Vom Phenylbutazon (Butazolidin) sind dem Tetrachlorkohlenstoff und dem Phalloidin vergleichbare dosisabhängige Wirkungen auf das Leberparenchym bekannt. In Versuchen mit Schweineleberhormogenaten wurde der hemmende Einfluß von Butazolidin auf die Cortisoninaktivierung untersucht. Dabei zeigte sich, daß eine Hemmung der Cortisoninaktivierung bereits unter Dosen nachweisbar ist, die im therapeutischen Anwendungsbereich liegen (34).

Durch Zusatz des Antihistaminikums N-p-Brombenzyl-N- α -pyridyl-N'-methyl-N'-äthyl-äthylendiamin ("WV 761") zum Inkubationsmedium wird der Umsatz von Cortison in Rattenleberschnitten verlangsamt, und zwar sowohl die Hydrierung im Ring A, als auch die Reduktion der C₂₀-Ketogruppe; bei beiden Reaktionen ist das Ausmaß der Hemmung von der Inhibitorkonzentration abhängig. Wie parallel laufende Experimente mit Lebermikrosomenpräparationen gezeigt haben, ist die Hemmung der Ring-A-Hydrierung auf eine Aktivitätsverminderung der 4-en-5 α -Hydrogenase zurückzuführen. Als weiterer Mechanismus der Inhibitorwirkung wird eine Beeinflussung der Bereitstellung von reduziertem NADP für die Steroidhydrierung diskutiert. Die Hemmung der Cortisoninaktivierung durch "WV 761" bietet eine Erklärung für die verstärkte antiallergische Wirkung von Corticosteroiden in Kombination mit dem Antihistaminikum (65).

Eine experimentell durch einseitige Nephrektomie und Nierenkompression auf der Gegenseite ausgelöste arterielle Hypertonie bei männlichen Wistarratten führte zu einer deutlichen Steigerung der Reduktions-

kapazität von 4-en-3-Ketosteroiden. Die Reduktionskapazität für Cortisol war bei hypertensiven Ratten um das 2.1-Fache, für Corticosteron um das 2.4-Fache größer als bei gesunden Tieren. Tiere, die trotz experimenteller Nierenschädigung keinen Hypertonus entwickelten, verhielten sich hinsichtlich der Steroidreduktion wie die Kontrollen. In Anbetracht des während der Versuche in ausreichenden und gleichbleibenden Mengen vorhandenen Wasserstoffs in Form von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ist vor allem an eine Änderung des Leberenzymgehaltes oder pH-Verschiebungen zu denken, die eine Aktivitätssteigerung der Reduktasen verursachen könnten. Der genaue Mechanismus dieses Phänomens bedarf noch weiterer Klärung (68).

Auch nach intraperitonäaler Applikation von Thyroxin bei Ratten zeigten die den Ring A reduzierenden Hydrogenasen eine Zunahme ihrer Aktivität. Diese Aktivitätssteigerung betraf ausschließlich mikrosomal lokalisierte Enzyme, während die im Cytoplasma lokalisierten Enzymaktivitäten unverändert blieben. Zugabe von reaktionsfähigem $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zum Inkubationsmedium steigerte die Aktivität der Reduktasen unbehandelter Versuchstiere um ein Vielfaches, während thyroxinbehandelte Tiere nur relativ geringe Steigerungen der Enzymaktivitäten aufwiesen. Die Umsatzraten beider Versuchsgruppen waren quantitativ jedoch gleich. Die Zunahme der Enzymaktivität wird in der durch Thyroxin vermehrten Bereitstellung reaktionsfähigen Wasserstoffs in Form von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ gesehen (45, 46).

Versuche mit Ratten, die mit 2-Methyl-1,4-naphtochinon (Menadion, Vitamin K₃) vorbehandelt wurden, zeigten eine Hemmung cortisolreduzierender Enzyme um 50 % durch diese Substanz. Unter vermehrter Zufuhr

von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ wurde in vitro eine deutlich geringere Hemmung beobachtet, ohne daß dabei jedoch die Umsatzraten unbehandelter Tiere erreicht worden wären. Vermutlich verursacht ein Mangel an reaktionsfähigem Coenzym die Reduktionshemmung im Ring A, der möglicherweise durch einen gesteigerten NADPH-Verbrauch im mikrosomalen Diaphorase-System durch Menadion zu erklären ist (38). Dieser Befund erklärt auch die in vivo festgestellte Potenzierung der Cortisolwirkung nach Menadionapplikation.

Auch nach Nahrungsentzug zeigen die cortisolinaktivierenden Enzyme einen deutlichen Aktivitätsverlust. Die Ursache dieser Hemmung ist zu einem - wahrscheinlich geringeren - Teil in einer Enzymproteinschädigung zu suchen, zum anderen aber in einem erheblichen Absinken der Glycogen- und Glucosekonzentrationen auf weniger als 10 % der physiologischen Werte. Infolgedessen werden nur ungenügende Mengen an reduziertem NADP aus der Glucose-6-Phosphat-Dehydrierung bereitgestellt (siehe Abb. 6). Dieser Coenzymmangel verursacht die Hemmung der Hydrierung im Ring A (66).

Derselbe Mechanismus der coenzymbedingten Enzymhemmung wird auch bei der Verlangsamung der 4-en-5 α -Reduktion von Cortison durch Leberschnittpräparate alloxandiabetischer Ratten vermutet. Da Inkubationen von Mikrosomenpräparationen in Verbindung mit einem $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -generierenden System sowohl bei diabetischen wie auch bei normalen Tieren gleiche Enzymaktivitäten zeigten, liegt der Schluß einer mangelnden Bereitstellung an reaktionsfähigem Coenzym nahe (63). Versuchstiere, deren experimenteller Alloxan-diabetes mit Insulin ausreichend behandelt wurde, reduzierten Cortisol im Ring A in gleichem Ausmaß wie gesunde Tiere (25).

Nach diesen verschiedenartigen experimentellen Untersuchungen lassen sich Aktivitätsänderungen der 4-en-5-Reduktasen durch zwei Mechanismen erklären:

1.: Durch toxische Einflüsse entstehen Veränderungen im Proteinstoffwechsel, die zu direkter Enzymschädigung führen.

2.: Durch Störungen des intrazellulären Stofftransports und protonenliefernder Reaktion entsteht ein Mangel an reaktionsfähigem Coenzym, der zu einer indirekten Enzymhemmung führt.

6.4. Mögliche Schlußfolgerungen zur Pathophysiologie der hormonellen Homöostase

Unsere Beobachtungen am Versuchstier könnten von wesentlicher Bedeutung für die Pathophysiologie der hormonellen Homöostase sein. Wenn unter Alkoholeinfluß der Testosteronabbau verzögert und quantitativ vermindert ist, könnte diese Veränderung zu einer Verlängerung der Halbwertszeit für Testosteron führen. Nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung könnte dieses verzögert abgebaute Testosteron die hypothalamische GRF- (gonadotropine releasing factor) Freisetzung vermindern. Die Folge wäre eine geringere Stimulation der Gonadotropin-Sekretion und der testikulären Androgenproduktion. Wirkt der Schädigungsfaktor Alkohol nur kurzfristig, so wären kaum Funktionsbeeinträchtigungen des Hypothalamus-Hypophysen-Testes-Systems zu erwarten. Wirkt er dagegen langfristig, wären Störungen der hormonellen Regulation im Sinne einer dauerhaften Senkung der Androgenproduktion denkbar. Mangelnde gonadotrope Aktivität müßte zu einer testikulären Atrophie führen. Ein solches Konzept kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings nur spekulativ entworfen werden. Zur Sicherung einer derartigen Hypothese wären weitere experimentelle Untersuchungen notwendig, die z.B. die Frage der Testosteron-Halbwertszeit unter standardisierter experimenteller Leberschädigung klären müßten. Welche Bedeutung sich an diesen Vorstellungen für die Pathologie des Steroidstoffwechsels beim Menschen ergibt, läßt sich ebenfalls noch nicht abschätzen. Es ist jedoch zu erwarten, daß Beeinträchtigungen des Androgenstoffwechsels bei akuten und chronischen Leberschädigungen von größerer Bedeutung sind, als bisher angenommen wurde.

7. Z U S A M M E N F A S S U N G

Unter dem Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff, Phalloidin und unter kontinuierlicher Alkoholzufuhr im Trinkwasser wurde an männlichen Rattenlebern die Reduktionskapazität für Testosteron und Androstendion in Schnitt- und Mikrosomeninkubationen untersucht.

1. Nach CCl_4 und Phalloidin sinkt die Abbaurrate für beide Androgene rasch ab. Zusatz eines $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -regenerierenden Systems hat keinen Einfluß auf die Enzymaktivität der Delta 4 - 5 - Hydrogenasen. Hier handelt es sich wahrscheinlich um eine direkte Enzymproteinschädigung, die im Versuch nicht reversibel ist.
2. Nach oraler Alkoholzufuhr sinkt die Reduktionskapazität ebenfalls signifikant ab. Der Aktivitätsabfall der Delta 4-5-Hydrogenasen ist jedoch reversibel. Unter Zugabe eines $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -regenerierenden Systems ist keine Verminderung der Enzymaktivität feststellbar. Die verminderte Reduktionskapazität beruht in diesem Fall auf einer indirekten, coenzymbedingten Aktivitätsänderung der Delta-4-5-Hydrogenasen.
3. Als Abbauprodukte von Testosteron und Androstendion entstehen vor allem Androsteron und Aetiocholanolon. Das Verhältnis dieser Metaboliten zueinander, das sich durch den Quotienten Androsteron/Aetiocholanolon bzw. 5α -Steroid/ 5β -Steroid ausdrücken läßt, verändert sich nach kontinuierlicher Alkoholzufuhr zugunsten des 5β -Steroids, wobei die Bildung von 5α -Metaboliten quantitativ vermindert wird.

Die Ergebnisse zeigen, daß akute und chronische Leberschäden bei der Ratte qualitativ und quantitativ bedeutsame Störungen der Inaktivierung von Testosteron und Androstendion zur Folge haben. Es ist anzunehmen, daß sich daraus sowohl für die homöostatische Regulation als auch für die biologische Wirksamkeit der Androgene wesentliche Veränderungen ergeben. Femininisierungerscheinungen bei Lebererkrankungen könnten aufgrund dieser Ergebnisse neue Erklärungen finden.

8. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ADLER, A.E.: Erkennung und Behandlung von Pilz-
vergiftungen
Dtsch. med. Wschr. 86 (1961), 1121
2. ADLERCREUTZ, H.: Oestrogen Metabolism in Liver
Disease
J. Endocr. 40 (1970), 129
3. BEARY, M.E.: Steroid Metabolism in Carbon Tetra-
chloride-Induced Liver Damage
Biochem. J. 103 (1967), 54
4. BERCOVICI, J.P., P. MAURAIIS-JARVIS:
Testosterone Metabolism in Liver
Cirrhosis
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol.
XVI (1971), 805
5. BLAQUIER, J., E. FORCHIELLI, R.I. DORFMAN:
In Vitro Metabolism of Androgens
in Whole Human Blood
Acta Endocr. 55 (1967), 697
6. BOCK, H.E., F.W. ALY, M. EGGSTEIN, W. GEROK, W. KAUFFMANN,
G. SCHEUERLEN, H.D. WALLER:
Biochemische Befunde an Kranken mit
Pilzvergiftungen
Klin. Wschr. 42 (1964), 1039
7. BOCK, H.E., H. NIETH, E. ZYSNO, J. GAYER, CH. FRÖHLICH:
Die Knollenblätterschwammvergiftung
Dtsch. med. Wschr. 89, (1964), 1617
8. BODE, CH., H. GOEBELL, M. STÄHLER:
Änderungen der Alkoholdehydrogenase-
Aktivität in der Rattenleber durch
Eiweißmangel und Äthanol.
Z. ges. exp. Med. 152 (1970), 111
9. BODE, CH., H. KONO, H. GOEBELL, CH. BODE, G.A. MARTINI:
Zur Pathogenese der Fetteinlagerung
in die Leber durch Alkohol. III.
Klin. Wschr. 48 (1970), 1180

10. BODE, Ch., E. STÄHLER, H. GOEBELL:
Zur Eliminierung von Trübungsfehlern
bei der Eiweißbestimmung mit der
Biuret-Methode
Z. klin. Chem. u. Biochem. 6 (1968), 418
11. BOLT, W., F. RITZL, H. M. BOLT:
Enterohepatischer Kreislauf und
Sexualhormonstoffwechsel beim Menschen
Münch. med. Wschr. 108 (1966), 875
12. BREUER, J., E. WOBSER: Bindung von Steroidhormonen an
Serumprotein bei Lebererkrankungen
Symp. Dtsch. Ges. Endokr. 15, 186
Springer, Berlin-Heidelberg-New York
1969
13. BÜTTNER, H.: Aldehyd- und Alkoholdehydrogenase-
Aktivität in Leber und Niere der Ratte
Biochem. Z. 341 (1965), 300
14. CASPI, E., H. LEVY, O. HECHTER:
Cortisone Metabolism in Liver; Isolation
of Certain Cortisone Metabolites
Arch. Biochem. Biophys. 45 (1953), 169
15. DENK, H., J. B. SCHENKMANN, P. G. BACCHIN, F. HUTTERER,
F. SCHAFFNER, H. POPPER:
Mechanism of Cholestasis; Interaction of
Synthetic Detergents with the Microsomal
Cytochrome P-450 Dependent Biotransforma-
tion System in Vitro
Exp. Molecul. Pathol. 14 (1971), 423
16. DIRSCHERL, W., H. R. HENRICHS, R. CASPARI:
In vitro-Versuche zur proteinanabolen
Wirkung des Testosterons
Acta Endocr. 59 (1968), 433
17. DORFMAN, R. I.: Die Biosynthese der Androgene und
Oestrogene
Med. Mittlg. Schering 19 (1958), 3
18. DORFMAN, R. I., R. A. SHIPLEY:
Androgens, Biochemistry, Physiology and
Clinical Significance
Wiley, New York 1956
19. EDMONDSON, H. A., S. J. GLASS, S. N. SOLL:
Gynaecomastia Associated with Cirrhosis
of the Liver
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 42 (1939), 97

20. ENDAHL, G.L., C.D.KOCHAKIAN, D.HAMM:
Separation of a Triphosphoryridine
Nucleotide-specific 17β -Hydroxy-
(testosterone)dehydrogenase of Guinea
Pig Liver
J. Biol. Chem. 235 (1960), 2792
21. ENGELHARDT, D., J.EISENBURG, P.UNTERBURGER, H.J.KARL:
Untersuchungen über den Stoffwechsel
von Testosteron und $\Delta 4$ Androstendion
in der Leber des Menschen
Klin. Wschr. 7 (1971), 439
22. ENGELHARDT, D., M.WIEDEMANN, H.J.KARL:
Untersuchungen über den Stoffwechsel
von Testosteron in der Haut des
Menschen
Verh. Dtsch.Ges. innere Med. 76
(1970), 879
23. ESSLINGER, F.: Knollenblätterschwammvergiftung -
ein klinischer Erfahrungsbericht
Med. Welt 19 (1966), 1055
24. FORCHIELLI, E., R.I.DORFMAN: Separation of $\Delta 4$ - 5α -
and $\Delta 4$ - 5β -Hydrogenases from Rat
Liver Homogenates
J. biol. Chem. 223 (1956), 443
25. GARREN, L.D., G.F.CAHILLY: Effect of Experimental
Diabetes on Steroid Metabolism
J. Biol. Chem. 238 (1963), 2923
26. GUSTAFSSON, J.A., B.P.LISBOA:
Studies on the Metabolism of C-19-
Steroids in Rat Liver: Hydroxylation
of Androstenedione in Rat Liver
Microsomes
Acta Endocr. 65 (1970), 84
27. HORTON, R., J.F.TAIT: Androstenedione Production and
Interconversion Rates Measured in
Peripheral Blood and Studies on the
Possible Site of its Conversion to
Testosterone
J. Clin. Invest. 45 (1966), 301
28. HÜBENER, H.J.: zit. nach HÜBENER und STAIB:
Biochemie der Nebennierenrinden-
hormone (29)
V. Coll. Ges. physiol. Chem.
Springer, Mosbach 1954

29. HÜBENER, H. J., W. H. STAIB:
 Biochemie der Nebennierenrindenhormone
 Thieme, Stuttgart 1965
30. HUTTERER, F., H. DENK, P. G. BACCHIN, J. B. SCHENKMANN,
 F. SCHAFFNER, H. HOPPER:
 Mechanism of Cholestasis; Effect of Bile
 Acids on the Microsomal Electron Transfer
 System in Vitro
 Life Sci. 9 (1970), 1159
 Mechanism of Cholestasis; Effect of Bile
 Acids on Microsomal Cytochrome P-450 De-
 pendent Biotransformation System in Vitro
 Life Sci. 9 (1970), 877
 Alteration of Microsomal Biotransformation
 in the Liver in Cholestasis
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133 (1970), 702
31. ISSELBACH, K. J.:
 Enzymatic Mechanism of Hormone Metabolism;
 Mechanism of Hormonal Glucuronide Formation
 Recent Progr. Horm. Res. 12 (1956), 134
32. KARL, H. J., M. WIDEMANN, L. RAITH:
 Produktion und Stoffwechsel von Corticosteroi-
 den und Androgenen bei der Leberzirrhose
 Klin. Wschr. 49 (1971), 340
33. KELCH, R. P., U. B. LINDHOLM, R. B. JAFFE:
 Testosterone Metabolism in Target Tissues
 J. Clin. Endocr. 32 (1971), 449
34. KERSTEN, H., H. J. STAUFINGER:
 Der Einfluß von Butazolidin auf die Cortison-
 inaktivierung in Leberhomogenaten
 Klin. Wschr. 34 (1956), 523
35. KLEMPIEN, E. J., K. D. VOIGT, J. TAMM:
 Der Umsatz von Dehydroepiandrosteron in
 der Hundeleber
 Acta Endocr. 36 (1961), 498
36. KRÖNER, H., W. STAIB:
 Leberenzyme bei akuter Tetrachlorkohlen-
 stoffvergiftung
 Z. klin. Chem. u. Biochem. 6 (1968), 318
37. KRÖNER, H., W. STAIB:
 Enzymaktivität und Proteinsynthese in
 geschädigten Geweben
 Z. klin. Chem. u. Biochem. 7 (1969), 175

38. KUPFER,D., L.PEETS:
Inhibition of Cortisol Metabolism in vitro
by 2-Methylnaphtoquinone (Menadion): A
possible Interpretation of the Potentiation
of Cortisol Activity in vivo
Experientia 24 (1968), 893
39. LEYBOLD,K., H.J.STAUDINGER:
Geschlechtsunterschiede im Stoffwechsel von
Rattenlebermikrosomen
Biochem. Z. 331 (1959), 389
40. LEYBOLD,K., H.J.STAUDINGER:
Kinetische Untersuchungen über den Steroid-
stoffwechsel mit Lebermikrosomen weiblicher
Ratten.
Biochem.Z. 331 (1959), 399
41. LEYBOLD,K., H.J.STAUDINGER:
Phosphat und Arsenat als Co-Faktor der DPNH-
abhängigen mikrosomalen Hydrierung von
4-3-Ketosteroiden in vitro
Biochem. Z. 337 (1963), 320
42. LIPSETT,M.B., S.G.KOREMAN:
Androgen Metabolism
J. Amer. Med. Ass. 190 (1964), 757
43. LITTMANN,K.P., H.GERDES, G.WINTER:
Kinetik und Charakterisierung der östradiol-
sensitiven 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen
in der menschlichen Leber
Acta Endocr. 67 (1971), 473
44. McGUIRE,J.S., V.W.HOLLIS, G.M.TOMKINS:
Some Characteristics of the Mikrosomal
Steroid Reductase (5 α) of Rat Liver
J. Biol. Chem. 235 (1960), 3112
45. McGUIRE,J.S., G.M.TOMKINS:
Effect of Thyroxine Administration on the
Rate and Steric Course of Enzymatic Reduc-
tion of Steroids
Nature 182 (1958), 261
46. McGUIRE jr. J., G.M.TOMKINS:
The Effect of Thyroxine Andministration on the
Enzymatic Reduction of Δ 4-3-Ketosteroids
J. Biol. Chem. 234 (1959), 791
47. McGUIRE jr. J., G.M.TOMKINS:
The Heterogenity of Δ 4-3-Ketosteroid
Reductases
J. Biol. Chem. 235 (1960), 1634
48. NEHER,R.: Biosynthese des Testosteron
Symp. Dtsch. Ges. Endokr. 13, 1
Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1967

49. NIESCHLAG, E., A.A.A. ISMAIL:
Bestimmung der Tagesschwankungen des Plasma-
Testosterons normaler Männer durch kompeti-
tive Proteinbindung
Klin. Wschr. 48 (1970), 53
50. v. OLDERSHAUSEN, H.F.:
Über die Pathogenese alkoholischer Leber-
schäden
Dtsch. med. Wschr. 89 (1964), 867
51. PETERSON, R.E.: Adrenocortical Steroid Metabolism and Adrenal
Cortical Function in Liver Disease
J. Clin. Invest. 39 (1960), 320
52. PETERSON, R.E., B. WYNGAARDEN, S.L. GUERRA, A.B. BRODIE,
J.J. BUNIM:
The Physiological Disposition and Metabolic
Fate of Hydrocortisone in Man
J. Clin. Invest. 34 (1955), 1779
53. PINCUS, M.: Liver Damage and Estrogen Inactivation
Endocrinology 27 (1940), 838
54. PORTIUS, J.J., K. REPKE:
Hydroxysteroid-Dehydrogenasen; Δ 5-3-Keto-
steroid-Isomerase und Δ 4-Steroid-Hydro-
genase in roten Blutzellen
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
u. Pharm. 239 (1960), 299
55. PRUNTY, F.T.G.: Androgen Metabolism in Man - Some Current
Concepts
Brit. Med. J. 2 (1966), 605
56. RAITH, L., M. WIEDEMANN, H.J. KARL:
Beziehungen zwischen Produktion, Metabolis-
mus und Ausscheidung von Corticosteroiden
und Androgenen bei der Leberzirrhose
Verh. Dtsch. Ges. innere Med. 76 (1970), 893
57. ROBERTS, K.D., R.L. van de WIELE, S. LIEBERMANN:
The Conversion in Vivo of Dehydroisoandro-
sterone Sulfate to Androsterone and
Eticholanolone Glucuronidates
58. SANDBERG, A.A., R.Y. KIRDANI, N. BACK, P. WEYMAN,
W.R. SLAUNWHITE jr.:
Biliary Excretion and Enterohepatic Circula-
tion of Estrone and Astriol in Rodents
Amer. J. Physiol. 213 (1967), 1138
59. SCHNEIDER, J.J.: Further Isolation of Adrenocortical
Compounds from Male Urine
J. Biol. Chem. 194 (1952), 337

60. SCHNEIDER, J.J., P.M.HORSTMANN:
Effects of Incubating Desoxycorticosterone
with Various Rat Tissues
J. Biol. Chem. 191 (1951), 327
61. SCHNEIDER, J.J., P.M.HORSTMANN:
Effects of Incubating Compound E and Related
Steroids with Various Surviving Rat Tissues
J. Biol. Chem. 196 (1952), 629
62. SCHRIEFERS, H.: Factors Regulating the Metabolism of
Steroids in the Liver
Schering Symp. on Biodyn. and Mechan. of
Action of Steroid Horm., Pergamon Press,
Vieweg 1968
63. SCHRIEFERS, H., N.HERBORN, F.POHL:
Über den Einfluß des Alloxandiabetes auf den
Cortisonstoffwechsel in der Rattenleber
Acta Endocr. 46 (1964), 89
64. SCHRIEFERS, H., W.KORUS, W.DIRSCHERL:
Vergleichende Untersuchungen über den Stoff-
wechsel von Cortison und anderen antirheu-
matisch wirksamen Steroiden in Ratten-
leberschnitten
Acta Endocr. 26 (1957), 331
65. SCHRIEFERS, H., M.OTTO, F.POHL:
Stoffwechsel von Cortison in Rattenleber-
präparationen in vitro unter der Einwirkung
des Antihistaminikums N-p-Brombenzyl-N-
alpha-pyridyl-N'-methyl-N'-äthyl-äthylendi-
amin ('WV 761')
Arzneimittelforschung 19 (1969), 1135
66. SCHRIEFERS, H., M.PRITTEL, F.POHL:
Über den Einfluß des Ernährungszustandes
der Ratte auf den Cortison- und Kohlen-
hydratstoffwechsel in der Leber
Acta Endocr. 40 (1962), 140
67. SCHRIEFERS, H., E.WASSMUTH, K.LAUFES:
Koppelung von Glucosephosphorylierung und
Cortisonhydrierung in Rattenleberpräpa-
rationen
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.
350 (1969), 183
68. SILAH, J.G.: Reduction of the $\Delta 4$ -3-Ketosteroids by
Normal and Hypertensive Rat Liver
Endocrinology 87 (1970), 90
69. SJÖVALL, J.: Bile Acids in Man under Normal and Patholo-
gical Conditions; Bile Acids and Steroids
Clin. Chim. Acta 5 (1960), 33

70. SLATER, T.F., B.C.SAWYER:
The Effect of Carbon Tetrachloride on Rat Liver Microsomes during the First Hour of Poisoning in vivo, and the Modifying Actions of Promethazine
Biochem. J. 111 (1969), 317
71. SMITH, M.E., E.J.NEWMAN, H.W.NEWMAN:
Effect of Increased Disphosphopyridine Nucleotide Levels on Rate of Ethanol Metabolism in the Mouse
Proc. Soc. Exp. Biol. 95 (1957), 541
72. SMITH, M.E., H.E.NEWMAN:
The Rate of Ethanol Metabolism in Fed and Fasting Animals
J. Biol. Chem. 234 (1959), 1544
73. STAIB, W., W.TELLER, F.SCHARF:
Steroidkonjugate, IV; Über die Ausscheidung von 17-Ketosteroidsulfaten und -glucuroniden im menschlichen Harn
Z. physiol. Chem. 318 (1960), 163
74. STAIB, W.:
Testosteron - Der intrazelluläre Stoffwechsel - Quantitative Bestimmung von Testosteron im Harn
Symp. Dtsch. Ges. Endokr. 13, 32
Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1967
75. SWEAT, M.L., L.T.SAMUELS:
The Relation of Diphosphopyridine Nucleotide and Citrate to the Metabolism
J. Biol. Chem. 175 (1948), 1
76. SWEAT, M.L., L.T.SAMUELS, R.LUMRY:
Preparation and Characterisation of the Enzyme which converts Testosterone to Androstenedione
J. Biol. Chem. 185 (1950), 75
77. TALBOT, N.B.:
The Inactivation of Endogenous Estrogen by the Liver
Endocrinology 25 (1959), 601
78. TAMM, J.:
Der Testosteronstoffwechsel beim Menschen - Biosynthese des Testosterons -
Dtsch. med. Wschr. 92 (1967), 1983
79. TAMM, J.:
Der Testosteronstoffwechsel beim Menschen - Der periphere Stoffwechsel des Testosterons -
Dtsch. med. Wschr. 92 (1967), 2080

80. TELLER, W.: Der C₁₉- und C₂₁-Steroidstoffwechsel während der Pubertät
Internist 8 (1967), 208
81. TOMKINS, G.M.: A Mammalian 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase
J. Biol. Chem. 218 (1956), 437
82. TOMKINS, G.M.: The Enzymatic Reduction of Δ 4-3-Keto-steroids
J. Biol. Chem. 225 (1957), 13
83. TOMKINS, G.M.: Enzymatic Metabolism of Corticosteroids
Ann. New York Acad. Sci. 82 (1959), 836
84. TOMKINS, G.M., K.J. ISSELBACHER:
Enzymatic Reduction of Cortisone
J. Amer. Chem. Soc. 76 (1954), 3100
85. WENZEL, M., K.U. BLUM, E. KRAAS:
Die Inaktivierung von Östradiol durch Oxydation nach Leberschädigung bei Ratten und bei leberkranken Patienten
Z. klin. Chem. u. Biochem. 6 (1968), 265
86. WIELAND, O., H.E. FISCHER, M. REITER:
Über den Wirkungsmechanismus des Knollenblätterpilzgiftes α -Amanitin
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharm. 215 (1952), 75
87. WIELAND, TH., O. WIELAND:
Chemistry and Toxicology of the Toxins of Amanita Phalloides
Pharmacol. Rev. 11 (1959), 87
88. WILSON, H., M.B. LIPSETT:
Metabolism of Epitestosterone in Man
J. Clin. Endocr. 26 (1966), 902

C H E M I K A L I E N

1. Aethanol, absolut. p.a.; Merck
2. Aetiocholanol-(3 α)-on(17), f. biochem. Zwecke; Merck
3. 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol; Ikapharm
4. 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol; Ikapharm
5. Androsten-(4)-dion-(3,17), f. biochem. Zwecke; Merck
6. Androsteron, f. biochem. Zwecke; Merck
7. Anisaldehyd; Merck
8. Aquasol; New England Nuclear Pilot Chemicals Div.
9. Benzol, p.a.; Merck
10. Calciumchlorid, rein, mind. 95 %; Merck
11. Cortisol, f. biochem. Zwecke; Merck
12. Dehydroepiandrosteron, f. biochem. Zwecke; Merck
13. Dichlormethan, p.a.; Merck
14. Essigsäure-aethylester, p.a.; Merck
15. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Reinheitsgrad I,
f. analyt. Zwecke (Kristallsusp.), 5 mg/ml; Boehringer
Mannheim
16. Glucose-6-Phosphat, Dinatriumsalz; Fluka
17. (1,1,1,3,3,3-)Hexamethyldisilazan, zur Synthese; Merck
18. n-Hexan, rein; Merck
19. Kaliumchlorid, p.a.; Merck
20. Kaliumcyanid, p.a.; Merck
21. Kaliumjodid, neutral, p.a.; Merck
22. Kaliumnatriumtartrat, $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4 H_2O$, p.a.; Merck
23. Kupfer (II)-sulfat, $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, p.a.; Merck
24. Magnesiumchlorid, $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, p.a.; Merck
25. Magnesiumsulfat, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, p.a.; Merck
26. Methanol, p.a.; Merck
27. Natriumchlorid, krist., p.a.; Merck
28. Natriumhydroxyd Plätzchen, p.a.; Merck
29. di-Natriumhydrogenphosphat, $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$, p.a. Merck
30. Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, Dinatriumsalz;
Boehringer, Mannheim

31. Phalloidin, krist.; Max-Planck-Inst., Heidelberg
32. Saccharose, p.a.; Merck
33. Salzsäure, 1 n, "Titrisol"; Merck
34. Schwefelsäure, konz., 95 - 97 %, p.a.; Merck
35. Testosteron, f. biochem. Zwecke; Merck
36. Testosteron-1,2 β -³H; Radiochemical Centre,
Amersham, Buckinghamshire
37. Tetrachlorkohlenstoff, p.a.; Merck
38. Trichloressigsäure, p.a.; Merck
39. Trimethylchlorsilan, puriss.; Fluka
40. Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, p.a.; Merck

Herrn Prof. Dr. G.A. Martini danke ich für
die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik und
für die Übernahme des Correferates.

Herrn Prof. Dr. H. Gerdes danke ich für die
Übernahme des Referates.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Dr. K.-P. Littmann für die Überlassung des
Themas sowie für seine Unterstützung und Beratung
bei der Ausführung der Versuche und während der
gesamten Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 6. Mai 1945 wurde ich, Wolfgang Spuck, als dritter Sohn des Amtsarztes Dr. med. Friedrich Spuck und seiner Ehefrau Hildegard geb. Böhm in Lich geboren.

1947 zogen wir nach Büdingen/Oberhessen, wo ich 1951 eingeschult wurde. Nach vier Jahren Volksschule besuchte ich die Wolfgang-Ernst-Schule (Gymnasium) in Büdingen, an der ich 1964 die Reifeprüfung bestand.

Nach zweijähriger freiwilliger Dienstzeit bei der Bundeswehr begann ich 1966 das Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg. 1967 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, 1969 die ärztliche Vorprüfung ab. Z.Zt. befinde ich mich im Medizinischen Staatsexamen, welches ich voraussichtlich im Dezember 1972 abschließen werde.

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die
Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Beckmann, Berendes, Bommer, Brück, Buchholz,
Daume, Dimroth, Dittrich, Dölle, Exner, Friederich,
Ganz, Gerdes, Golenhoven, Graul, Hamelmann, Hardewig,
Havemann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Hort,
Ihm, Jacob, Kaffarnik, Karlson, Koransky, Korb, Linneweh,
Mann, Mannheim, Mahr, Martini, Mattes, Neurath, Petry,
Pots, Reim, Riecken, Rodeck, Rohen, Schmid, Schmidt,
Schmitz-Moörmann, Schiff, Schleyer, F. Seidel, W. Seidel,
Sekeris, Siegert, Siess, Solcher, Sommerkamp, v. Stosch,
Straub, Strohmeyer, Stutte, Voss, Walcher, Wendt,
Wiegand, Willenbockel, Wolter, Zilliken.

